

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 782**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/4412</b>	(2006.01)	<b>A61N 5/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/136</b>	(2006.01)	<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/09</b>	(2006.01)	<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/351</b>	(2006.01)	<b>C12Q 1/68</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/407</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/50</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/44</b>	(2006.01)		
<b>C07D 213/73</b>	(2006.01)		
<b>C07C 205/38</b>	(2006.01)		
<b>C07C 217/90</b>	(2006.01)		
<b>C07D 213/64</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/IB2012/057622**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093885**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12824809 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2793884**

54 Título: **Inhibidores de la vía de señalización de Notch y uso de los mismos en el tratamiento de los cánceres**

30 Prioridad:

**21.12.2011 EP 11010130**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.03.2018**

73 Titular/es:

**ECOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE  
LAUSANNE (EPFL) (100.0%)  
EPFL-TTO, Quartier de l'Innovation - J  
1015 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**RADTKE, FREDDY;  
LEHAL, RAJWINDER;  
REINMÜLLER, VIKTORIA y  
ZHU, JIEPING**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 660 782 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la vía de señalización de Notch y uso de los mismos en el tratamiento de los cánceres

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al uso de inhibidores de la vía de señalización de Notch, en particular la 6-(4-*tert*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) (número de CAS 218457-67-1) y sus derivados, para el tratamiento y/o prevención de los cánceres.

**Antecedentes de la invención**

10 La vía de señalización de Notch constituye un componente crítico en los circuitos moleculares que controlan el destino celular durante el desarrollo, la supervivencia celular y la proliferación celular (Shih leM, Wang TL en *Cancer Res* 2007; 67(5): 1879-82). La activación aberrante de esta vía contribuye a la oncogénesis. Los miembros de la familia de Notch han resultado ser oncogenes en un número de cánceres cada vez mayor. La función de Notch en el cáncer humano se ha visto resaltada recientemente por la presencia de mutaciones activadoras y amplificación de los genes de Notch en el cáncer humano, y por la demostración que los genes de la vía de señalización de Notch podrían ser dianas terapéuticas en potencia. Ya está claro que una de las principales dianas terapéuticas de la vía de Notch son los receptores Notch, en los que los inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa impiden la generación del dominio oncogénico (intracelular) de las moléculas de Notch y suprimen la actividad de Notch.

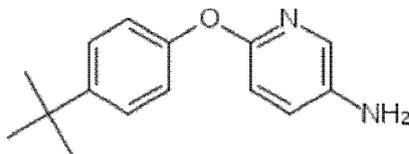
15 Aunque se ha avanzado significativamente a la hora de diseccionar el complejo funcionamiento de esta vía de señalización, se dispone de muy pocos inhibidores de Notch. No obstante, la clase pionera de inhibidores de Notch ya está en ensayos clínicos para unos pocos tipos de cáncer, tales como los inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa MK0752 de Merck Sharp & Dohme Corp. MK0752, y RO4929097 (Roche), una molécula pequeña sintética, inhiben la vía de señalización de Notch, lo que podría dar lugar a la inducción de la parada del crecimiento y la apoptosis en las células tumorales en las que la vía de señalización de Notch está sobreactivada.

20 Uno de los inconvenientes del uso de los inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa para bloquear la señalización de Notch, que se están comercializando o en investigación en la actualidad, es su amplio abanico de dianas adicionales, tales como la proteína del precursor amiloide, así como la ausencia de selectividad a la hora de bloquear la señalización de Notch a través de cuatro ligandos (Notch1, 2, 3 y 4). Debido a su capacidad para bloquear la señalización de Notch a través de los cuatro receptores, se sabe que los inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa provocan una metaplasia de células caliciformes en el intestino. Además, algunas de las neoplasias hemáticas y tumores sólidos albergan mutaciones en los receptores Notch (tales como translocaciones cromosómicas) que dan lugar a la expresión constitutiva de la forma activa dominante del NICD con independencia de la escisión por el complejo de la  $\gamma$ -secretasa. Por lo tanto, estos tumores no responden al tratamiento con inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa.

25 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de identificar y desarrollar más inhibidores específicos y selectivos de la vía de señalización de Notch que sean útiles para el tratamiento y/o prevención de cánceres.

**Compendio de la invención**

35 La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas y se limita a ellas. La presente invención se refiere a una 6-(4-*tert*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) de fórmula I



Fórmula I

40 o uno de sus derivados que tenga propiedades de inhibición de la vía de señalización de Notch, sales, solvatos, tautómeros, isómeros de la misma, para uso para el tratamiento y/o la prevención de un cáncer.

Un objeto más de la presente invención es dar a conocer una composición farmacéutica que comprende la composición farmacéutica que comprende la 6-(4-*tert*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) de fórmula I, o uno de sus derivados que tiene propiedades de inhibición de la vía de señalización de Notch, o sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, tautómeros, isómeros de la misma, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 La invención también contempla un kit que comprende una o varias dosis de la 6-(4-*tert*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3), o uno de sus derivados que tenga propiedades de inhibición de la vía de señalización de Notch, para usos en un método para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso.

Un objeto más de la invención es dar a conocer el uso de la 6-(4-*tert*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) de fórmula I, o

uno de sus derivados que tenga propiedades de inhibición de la vía de señalización de Notch, para inhibir *in vitro* la vía de señalización de Notch en las células.

Otro objeto de la descripción se refiere a un método para el tratamiento de un sujeto con un cáncer dependiente de Notch.

## 5 Descripción de las figuras

En la figura 1 se muestra que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) (número de CAS 218457-67-1) bloquea la activación de señalización de Notch mediada por el NICD. A) Las células N1-HeLa se cotransfectaron con el plásmido de expresión pcDNA3.Notch1, y los plásmidos pGL4.26-12xCSL con luciferasa y el SV40 para *Renilla*. Las células DL4-HeLa y N1-HeLa se cocultivaron en una placa de 96 pocillos en una proporción 1:1 (20.000:20.000 células/pocillo) y se trataron con DMSO o con 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de I3 y DAPT durante 24 horas. Se midió la activación de la vía de Notch mediante la cuantificación con el ensayo de la luciferasa indicadora impulsada por la señalización de Notch. El tratamiento del ensayo de cocultivo de DL4:N1 con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y DAPT hace que la activación de la señalización de Notch disminuya de forma dependiente de la concentración. B) Las células HeLa se transfectoron con el NICD y se trataron con DMSO o con 2, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$  de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3). Como control, las células cocultivadas se trataron también con 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$  del DAPT. La activación de la vía se midió con el ensayo de la luciferasa indicadora impulsada por Notch. El tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) sobre las células que expresan el NICD condujo a una atenuación de la señalización, mientras que el tratamiento con DAPT no tuvo ningún efecto sobre la activación de la señalización de Notch mediada por el NICD. C) El ensayo de cocultivo de DL4:N1 y de DL4:N2 se trató con I3 y DAPT (cada uno a 10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. El efecto de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y del DAPT sobre la activación de la vía impulsada por DL4-N1 y DL4-N2 se midió mediante la actividad de la luciferasa impulsada por Notch. Tanto el tratamiento con I3 como con DAPT bloquean la activación de la vía inducida por Notch1 y Notch2. D) La 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) inhibe la activación de la vía a través de los dominios intracelulares de Notch1 (NICD) y Notch2 (N2-ICD).

En la figura 2 se muestra que la inhibición de la señalización de Notch que está mediada por la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) se puede rescatar al incrementar la concentración de MAML1. Las células HeLa se cotransfectaron con 800 ng de NICD, más 3  $\mu\text{g}$  de pcDNA3.1 u 800 ng de NICD, más 1  $\mu\text{g}$  de MAML1-FLAG u 800 ng de NICD, y más 3 ng de los vectores de expresión con MAML1-FLAG. Para medir la activación de la vía de Notch, también se introdujo en las células el plásmido pGL4.26-12xCSL con la luciferasa. Se utilizó el SV40 para *Renilla* como control interno. Las células transfectadas con diferentes combinaciones y cantidades del plásmido se trataron con DMSO o una concentración creciente de 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) (1, 2,5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. La actividad de la luciferasa impulsada por 12xCSL se midió con un sistema dual del ensayo de la luciferasa. En ausencia de MAML1, la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) podía bloquear las activaciones de la señalización de Notch, pero el efecto inhibidor de Notch que tiene la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) disminuyó al incrementar la cantidad de MAML1.

En la figura 3 se muestra que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) inhibe la señalización de Notch y hace descender sus genes diana en las líneas de células cancerosas de humanos. A) Las células RPMI 8402 se trataron con DMSO, 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y DAPT (10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas, y se les analizó por qRT-PCR la expresión de los genes Hes1, cMyc y Dtx1, que son diana de Notch. Los datos se normalizaron por la HPRT como gen de mantenimiento. B) El lisado de células completas de las células tratadas con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) se analizó por inmunotransferencia de tipo Western. Con el uso de anticuerpos contra NICD (Val1744), Hes1 y cMyc, se determinó la concentración de la proteína de los genes diana de NICD y de Notch. C y D) Las líneas celulares de LLA-T de humano HPB-ALL y KOPTK1 se trataron con DMSO o 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) durante 24 horas. Se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos específicos contra NICD (Val1744) y Hes1. La tubulina sirvió de control de carga. E) El lisado de células completas de las células PANC1 (línea celular de cáncer de páncreas) tratadas con DMSO y 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) se analizaron por inmunotransferencia de tipo Western. La cantidad de proteína se determinó con anticuerpos específicos contra Hes1. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de la *t* de Student con dos colas. \* = valor de  $p < 0,05$ .

En la figura 4 se muestra que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) induce un bloqueo de la proliferación de las células cancerosas de humanos. Las líneas celulares humanas de LLA-T RPMI 8402 y KOPTK1, y la línea de las células cancerosas pancreáticas PANC1, así como células de melanoma impulsadas por nRas, se inocularon en una placa de 96 pocillos y se trataron con una concentración 10  $\mu\text{M}$  de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y del DAPT durante varios días. Sus efectos inhibidores del crecimiento se compararon con células tratadas con una cantidad igual de DMSO. Mediante el ensayo con alamarBlue® se siguió la cinética del crecimiento de RPMI 8402 y KOPTK1 durante un máximo de 6 días, mientras que las células PANC1 y las de melanoma impulsado por nRas se siguieron durante 4 días. El tratamiento de las células RPMI 8402, KOPTK1, PANC1 y del melanoma impulsado por nRas con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) provocó una reducción significativa de su potencial de crecimiento. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de la *t* de Student. \* = valor de  $p < 0,05$ . ns = no significativo.

En la figura 5 se muestra que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) bloquea el crecimiento dependiente de NICD de las células cancerosas de humanos. A) Las células DND41-Parental y DND41-NICD se trataron con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y el DAPT durante 24 horas. Se realizaron los análisis por inmunotransferencia de tipo Western para la proteína Hes1 con los anticuerpos específicos contra Hes1. Tanto el DAPT como la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) provocaron un descenso de Hes1 en las células DND41-Parental. Las células DND41-NICD mostraban un descenso de Hes1 solo cuando se trataban con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3). B) Se inocularon 5000 células DND41-Parental y se trataron con DMSO, 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y DAPT en una placa de 96 pocillos. La cinética de crecimiento de la línea celular parental se siguió durante 5 días con la lectura de alamarBlue®. El tratamiento de la línea celular DND41-Parental con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y el DAPT provocó una parada de la proliferación. C) De igual forma, las células DND41-NICD se trataron con DMSO, 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y DAPT, y su cinética de crecimiento se siguió con la lectura de alamarBlue® durante 5 días. El tratamiento de las células DND41-NICD con DAPT no tuvo un impacto significativo sobre su proliferación, mientras que el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) indujo una parada de la proliferación. D) La línea celular de cáncer de mama humano HCC1187 alberga una translocación cromosómica SEC22B-Notch2, lo que conduce a una expresión de la forma constitutivamente activa de NICD con independencia de la escisión por el complejo de la  $\gamma$ -secretasa. Esta mutación hace que esta línea celular se vuelva insensible al tratamiento con el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa. E) Se inocularon 2000 células HCC1187 por pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se trataron con DMSO, el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa DAPT e I3 durante 6 días. Se tomó la lectura con alamarBlue® el día 0, el día 2, el día 4 y el día 6. Se utilizaron ocho réplicas para cada tratamiento y punto temporal. El tratamiento de la línea celular de cáncer de mama humano HCC1187 con el DAPT, que inhibe la  $\gamma$ -secretasa, no alteró la cinética del crecimiento cuando se comparó con los equivalentes tratados con el DMSO, mientras que el tratamiento con la I3 provocó la inhibición estadísticamente significativa de la proliferación celular. Los valores de  $p$  se calcularon con la prueba de la  $t$  de Student. \* = valor de  $p < 0,05$ . ns = no significativo.

En la figura 6 se muestra que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) induce una parada del ciclo celular en G0/G1 y la apoptosis en las líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T de humano y en la línea celular de cáncer de mama humano HCC1187. A) Las líneas celulares de leucemia de humano (RPMI 8402, CUTL1, KOPTK1, TALL1 y HPB-ALL) se trataron con I3 (10  $\mu$ M). El porcentaje de la población celular (apoptótica) que dio positivo para la anexina V se midió por citometría de flujo. B) Análisis del ciclo celular: las líneas celulares RPMI 8402, KOPTK1 y TALL1 se trataron con I3 (10  $\mu$ M) y se tiñeron con Ki67 y la tinción de Hoechst para determinar el estado del ciclo celular. Los análisis del ciclo celular sugieren que el tratamiento con I3 provoca un incremento del 20-30% en las células paradas en la fase G0/G1 del ciclo celular. C) Las células HCC1187 se trataron con DMSO o 10  $\mu$ M de I3, y el porcentaje de la población apoptótica se midió con la tinción de anexina V. D) A las células HCC1187 tratadas con I3 se les analizó el estado del ciclo celular. La tinción con Ki67 y de Hoechst revelaron que la I3 induce una parada en G0/G1 en las células HCC1187.

En la figura 7 se muestra que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) simula el fenotipo de la pérdida genética de la señalización de Notch2 en el bazo. La pérdida de la señalización de Notch en el bazo conduce a una reducción de linfocitos B en la zona marginal (LBZM) del bazo. A) Esquema del plan experimental. B) Los ratones ( $n = 2$ ) se trataron con aceite o con 25 mg/kg de 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) durante 7 días consecutivos. Se les analizó el bazo el día 8. Con los anticuerpos específicos contra B220, se identificaron los linfocitos B en el bazo. Los LBZM dentro del compartimento de los linfocitos B se detectaron mediante anticuerpos contra los marcadores de superficie celular CD23 y CD21. El tratamiento de los ratones con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) provoca una reducción significativa del porcentaje de LBZM del bazo. B) El tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) provoca una reducción del número absoluto de LBZM del bazo cuando se compara con los animales tratados con el vehículo.

En la figura 8 se muestra que el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) incrementa la latencia del desarrollo de la leucemia en los ratones. A) A los ratones DNO/IDCG  $\gamma c^{-/-}$  se les inyectaron  $1 \times 10^6$  células HPB-ALL (que expresan la luciferasa). El día 15, las células leucémicas se consolidaron en la médula ósea. Los ratones se trataron cada día con aceite o con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3). Se tomaron imágenes de los ratones el día 27 con el sistema de toma de imágenes in vivo Caliper IVIS (Xenogen). El color rojo y el azul indica la intensidad de la señal de la luciferasa y se correlaciona con el número de células leucémicas. B) El tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) bloquea el crecimiento de las células de leucemia RPMI 8402 en el ensayo de xenotrasplante. A los ratones DNO/IDCG  $\gamma c^{-/-}$  se les trasplantaron  $5 \times 10^5$  células RPMI 8402 (que expresan la luciferasa). Se siguió el desarrollo de la leucemia con el sistema de toma de imágenes in vivo Caliper IVIS (Xenogen). El día 13, se comenzó un tratamiento diario con aceite ( $n = 3$ ) o la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) ( $n = 4$ ). Se trató a los animales durante 27 días (punto final del experimento).

En la figura 9 se muestra que el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) bloquea los tumores de mama de ratona MMTV-ErbB2. A) El nivel de expresión de la proteína Hes1 en los tumores de mama MMTV-ErbB2 y las glándulas mamarias (G.M.) normales emparejadas según la edad se compararon con el anticuerpo anti-Hes1. Los análisis de inmunotransferencia de tipo Western mostraron una expresión muy alta de la proteína Hes1 en los tumores de mama MMTV-ErbB2. La tubulina sirvió como control de carga. B) Se preparó una suspensión de células sueltas del tumor de mama MMTV-ErbB2 y se inyectaron  $1 \times 10^6$  células en la almohadilla grasa limpia de las ratonas FVB destinatarias. Se siguió la formación del tumor con regularidad. Una vez que se desarrolló el tumor hasta un volumen de 100-300 mm<sup>3</sup>, las ratonas se trataron con aceite ( $n = 2$ ) o 25 mg/kg de la 6-(4-*terc*-

butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) (n = 2). El volumen tumoral se midió cada 6-7 días. Las ratonas tratadas con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) mostraron una progresión del tumor lenta en comparación con las ratonas tratadas con aceite.

5 En la figura 10 se muestra la actividad inhibitora de Notch que tienen los derivados químicos de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3). Se analizaron diferentes derivados químicos de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) en un ensayo de cocultivo de DL4-N1 y el nivel de actividad de Notch se midió con un gen de luciferasa indicadora impulsado por Notch. Los derivados I3-A, I3-B, I3-C, I3-E, I3-G, I3-H, I3-M e I3-N muestran una actividad anti-Notch comparable con la de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3), mientras que en los derivados I3-F e I3-I aparece una mejora de la actividad.

## 10 Descripción detallada de la invención

Aunque los métodos y materiales parecidos o equivalentes a los descritos en la presente memoria se pueden utilizar en la puesta en práctica o para comprobar la presente invención, más adelante se describen los métodos y materiales idóneos.

15 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que conoce habitualmente el experto en la técnica a la que pertenece el tema en cuestión de la presente memoria. Tal y como se emplea en esta memoria, las siguientes definiciones se suministran para facilitar la comprensión de la presente invención.

20 Tal y como se emplea en esta memoria, la terminología «comprender/que comprende» se utiliza por lo general en el sentido de incluir/que incluye, es decir, que permite la presencia de uno o varios rasgos o componentes. La terminología «comprender» y «que comprende» también engloba los más restringidos «consistir en» y «que consiste en».

Tal y como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la forma singular «un», «uno» y «el» incluye las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

25 Para facilitar la lectura, la terminología «compuesto(s) de la invención» o «compuesto(s) de acuerdo con la invención» utilizados a lo largo de la descripción se refiere al compuesto 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) (número de CAS 218457-67-1), derivados de dicho I3, sales o solvatos del compuesto I3 o de los derivados, y a los isómeros, que incluyen enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros y racematos del compuesto I3, compuestos I3 con modificaciones químicas y derivados de dichos compuestos I3.

30 Tal y como se emplea en esta memoria, la terminología «sujeto» está bien reconocida en la técnica y se refiere a un mamífero, que incluye perro, gato, rata, ratón, mono, vaca, caballo, cabra, oveja, cerdo, camello y, lo más preferiblemente, un humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto que necesita el tratamiento o un sujeto con una enfermedad o trastorno, tal como cáncer. Sin embargo, en otras realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto normal o un sujeto que ya se ha sometido a un tratamiento contra el cáncer. La terminología no designa una edad o sexo concretos. Así pues, se pretende cubrir sujetos adultos, niños y recién nacidos, tanto masculinos como femeninos.

35 La terminología «cáncer», «células cancerosas», «enfermedades proliferativas celulares» y «trastornos proliferativos celulares», tal y como se emplean en esta memoria, hacen referencia o describen la afección fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular desregulado. De acuerdo con la presente invención, cáncer se refiere preferiblemente a tumores sólidos, tales como de cerebro, de mama, de próstata, colorrectal, de riñón, de pulmón, sarcoma o melanoma, y a tumores líquidos, que afectan a la sangre, tales como leucemia. Más preferiblemente según la presente invención, los cánceres son cánceres dependientes de Notch seleccionados del grupo que comprende leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (LLA-T), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma de células de Mantle, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, melanoma, tumores de cerebro, angiogénesis tumoral, cáncer colorrectal. Como alternativa, el cáncer dependiente de Notch es resistente al tratamiento con inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa. Ejemplos de tratamiento con inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa comprenden 1) inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa RO4929097 y maleato de cediranib para tratar a pacientes con tumores sólidos avanzados (NCT01131234), 2) inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa RO4929097 para tratar a pacientes jóvenes con tumores sólidos insensibles o recidivantes, tumores del SNC, linfoma, o leucemia de linfocitos T (NCT01088763), 3) estudio del MK-0752 en politerapia con el tamoxifeno o el letrozol para el tratamiento precoz del cáncer de mama (NCT00756717), 4) GDC-0449 y RO4929097 para tratar a los pacientes con sarcoma metastásico o avanzado (NCT01154452), 5) RO4929097 e hidrocloreuro de erlotinib para tratar a pacientes con cáncer de pulmón no microcítico de estadio IV o recurrente (NCT01193881), 6) bicalutamida y RO4929097 para tratar a pacientes con un cáncer de próstata tratado anteriormente (NCT01200810), 7) RO4929097 para tratar a pacientes con gliomas invasivos recurrentes (NCT01269411), 8) un inhibidor de la vía de señalización de Notch para los pacientes con leucemia/linfoma linfoblástica aguda de linfocitos T (LLA) (NCT00100152) y 9) RO4929097 para tratar a los pacientes con cáncer colorrectal metastásico (NCT01116687).

La vía de señalización de Notch está conservada evolutivamente y los protagonistas moleculares básicos de esta vía son ligandos (Delta y Jagged), receptores Notch y factores de transcripción (Shih leM, Wang TL en *Cancer Res*

2007; 67(5): 1879-82). Notch es un receptor heterodimérico transmembranario y hay cuatro miembros diferentes (Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4) en los humanos y en los roedores. En una afección fisiológica, la fijación del ligando de Notch a su receptor inicia la señalización de Notch mediante la liberación del dominio intracelular del receptor Notch (Notch-ICD) a través de una cascada de escisiones proteolíticas donde intervienen la  $\alpha$ -secretasa (también denominada enzima convertidora del factor  $\alpha$  de la necrosis tumoral) y la  $\gamma$ -secretasa. A continuación, el Notch-ICD intracelular liberado se traslada al núcleo, donde modula la expresión génica principalmente mediante la fijación a un factor de transcripción ubicuo, CBF1, supresor de la pérdida de pelo, Lag-1 (CSL). Esta fijación atrae a los activadores de la transcripción hacia el complejo CSL y lo convierte de un represor transcripcional a un activador, lo que enciende varios efectores vía abajo. Las funciones fisiológicas de la señalización de Notch tienen múltiples facetas, entre las que se incluyen el mantenimiento de las células madre, la especificación del destino celular y la regularización de la diferenciación en el desarrollo así como en la oncogénesis.

En el cáncer, las alteraciones genéticas moleculares, tales como la translocación cromosómica, las mutaciones puntuales y la amplificación cromosómica en los locus del receptor Notch, son los mecanismos conocidos para la activación constitutiva de la vía de Notch. A pesar de los diferentes mecanismos, todos ellos dan lugar a un incremento de la cantidad de Notch-ICD intracelular. El potencial oncogénico de Notch se descubrió primero en la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (LLA-T) de los humanos. Aunque la señalización de Notch1 es esencial para el desarrollo normal de los progenitores de los linfocitos T, la activación constitutiva de la señalización de Notch1 debido a alteraciones genéticas moleculares está asociada a la LLA-T. Por ejemplo, las deleciones intersticiales de la porción extracelular del Notch1 de humanos debido a la translocación cromosómica (7;9) está asociada a ~1% de los casos de LLA-T y las mutaciones puntuales activadoras de Notch1 están presentes en aproximadamente el 50% de los casos de LLA-T. Se observó la formación de la leucemia/linfoma de linfocitos T en un modelo de ratón transgénico con Notch-ICD, lo que indica una función causal de la activación de Notch en el desarrollo de la LLA-T. En el cáncer de pulmón no microcítico, se ha identificado en un subconjunto de tumores la translocación cromosómica (15;19) y se cree que la translocación eleva la transcripción de Notch3 en los tumores. En el cáncer de ovario, se halló que la amplificación del gen de Notch3 aparecía en aproximadamente el 19% de los tumores, y se halló la sobreexpresión de Notch3 en más de la mitad de los carcinomas serosos de ovario. De igual forma, se ha demostrado la activación de la señalización de Notch en el desarrollo del cáncer de mama. En los modelos animales, la expresión de Notch4 constitutivamente activa provoca tumores de mama en las ratonas y las mutaciones que activan Notch1 contribuyen al desarrollo de la LLA-T. Un estudio reciente muestra además que la sobreexpresión de Notch1 y Notch3 activados en las ratonas transgénicas bloquea el desarrollo de la glándula mamaria e induce los tumores de mama en las ratonas. La activación de la señalización de Notch también se ha visto que interviene en la metástasis de pulmón y ósea de las células del cáncer de mama. La sobreexpresión de Notch3 es suficiente para inducir la formación del tumor del plexo coroideo en un modelo de ratón, lo que sugiere que Notch3 interviene en el desarrollo de determinados tipos de tumores de cerebro.

Con el fin de realizar un cribado de alto rendimiento (masivo) para identificar nuevos moduladores (inhibidores) de la señalización de Notch, los solicitantes han establecido un ensayo de cocultivo para inducir una activación de la vía mediada por la unión del ligando al receptor. El ensayo de cocultivo se estableció con el ligando DL4 de Notch y el receptor Notch1 específicamente, ya que la activación de la vía mediada por el ligando DL4-N1 unido al receptor desempeña una función importante en las afecciones fisiopatológicas tales como la angiogénesis tumoral y la función del receptor Notch1 a la hora de inducir la leucemia de linfocitos T. Puesto que este ensayo depende de la expresión y de la interacción entre el ligando DL4 y el receptor Notch1, ofrece una oportunidad para interrogar de una manera controlada la señalización de Notch inducida por las interacciones ligando-receptor. La miniaturización de este ensayo en un formato de placa de 96 pocillos y de placa de 384 pocillos ayudó a los solicitantes a adaptar este ensayo para su realización de forma masiva. El uso de este ensayo de cocultivo para cribar colecciones de siRNA o de moléculas pequeñas puede conducir a la identificación de proteínas o compuestos químicos que son capaces de modular la señalización de Notch en diferentes etapas a lo largo de esta vía. Por ejemplo, un cribado masivo de colecciones de siRNA o de moléculas pequeñas puede producir moduladores de la vía capaces de actuar en las células que envían de la señal o que la reciben. Las alteraciones mediadas por proteínas o moléculas pequeñas en el reciclaje o el tráfico de los ligandos y los receptores hacia la membrana plasmática tendrían la posibilidad de bloquear la vía de Notch y se podrían estudiar con este ensayo. Además, este ensayo también puede ayudar a identificar proteínas o entidades químicas capaces de bloquear las interacciones entre el ligando y el receptor, la escisión S2 mediada por ADAM10/17, o la escisión S3 del receptor de Notch catalizada por la  $\gamma$ -secretasa, la translocación nuclear de la forma activa de Notch o las entidades capaces de bloquear el complejo de activación transcripcional.

Los solicitantes también han sido capaces de cribar tres diferentes colecciones de compuestos químicos (Microsource NIMDS, Prestwick y Maybridge Hit finder) que han conducido a la identificación de varios productos químicos, que son capaces de bloquear la señalización de Notch en diferentes puntos a lo largo de la vía.

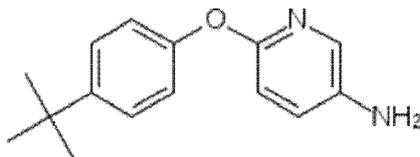
El uso del sistema de *Renilla* independiente de Notch como control interno permitió a los solicitantes eliminar los compuestos químicos citotóxicos, con lo que se reduce la tasa de candidatos positivos en falso. Además, este ensayo con células también ayudó a soslayar los problemas relacionados con la permeabilidad de la célula a los compuestos químicos para validar adicionalmente los candidatos.

El desarrollo del sistema de ensayo de cocultivo de DL4:N1 estableció los fundamentos para una campaña de

detección masiva. Este ensayo dio a conocer un sistema de lectura robusto y sensible para identificar nuevos moduladores (inhibidores) de la vía de Notch.

Los solicitantes identificaron varios compuestos químicos por su capacidad para bloquear la activación de la vía de Notch. Entre estos, identificaron el compuesto 6-(4-*tert*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) (número de CAS 218457-67-1) por su capacidad para bloquear la activación de la vía de Notch.

Así pues, la presente invención se refiere a la 6-(4-*tert*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) de fórmula I



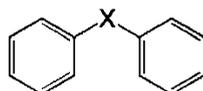
Fórmula I

para uso en el tratamiento y/o la prevención de un cáncer.

La presente invención también engloba las modificaciones químicas de la 6-(4-*tert*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) (número de CAS: 218457-67-1) para prolongar su vida útil en circulación. Ejemplos no limitantes de métodos para PEGilar fármacos de manera transitoria o reversible, que incluye los fármacos polipeptídicos, se dan a conocer en las patentes de los EE. UU. n.ºs 4.935.465 (expedida el 19 de junio de 1990) y 6.342.244 (expedida el 29 de enero de 2002); y la solicitud publicada en los EE. UU. número US 2006/0074024. El experto en la técnica encontrará típicamente más detalles sobre los reactivos basados en PEG en, por ejemplo, las solicitudes de patente publicadas WO 2005047366, US 2005171328, y las recogidas en el NEKTAR PEG Reagent Catalog® 2005-2006 (Nektar Therapeutics, San Carlos, Calif.).

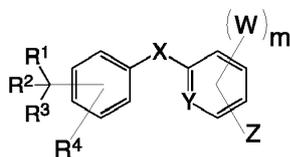
La presente invención engloba además los derivados químicos de dicha I3 que tengan propiedades de inhibición de la vía de señalización de Notch. Los solicitantes han demostrado que la 6-(4-*tert*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y sus derivados actúan selectivamente sobre la vía de Notch a nivel del complejo de activación transcripcional en el núcleo de tumores humanos resistentes a los inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa debido a las mutaciones mencionadas más arriba, que se espera que respondan al tratamiento con la 6-(4-*tert*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3). Además, la 6-(4-*tert*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) actúa selectivamente sobre la señalización de Notch, lo que limita sus efectos tóxicos secundarios.

Todos estos derivados comparten la siguiente estructura común:



Preferiblemente, en dichos derivados, X es O y la posición 3 (o *para*) es NH<sub>2</sub>.

Se describen en la presente memoria los siguientes derivados que tienen propiedades de inhibición de la vía de señalización de Notch



Fórmula II

en donde m es un número entero seleccionado de 1 a 4;

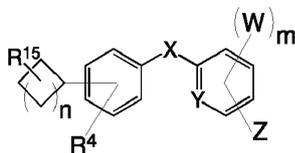
W se selecciona entre H y halógenos; el halógeno se selecciona de F-, Cl-, Br- o I-;

R1, R2, R3, R4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-, 3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *tert*-butilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> alquenilo, alquinilo; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 15;

X es O, S, CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, NR<sub>7</sub>, NHCOR<sub>8</sub>, o NHSO<sub>2</sub>R<sub>9</sub>; en donde R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-, 3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *tert*-butilo, o (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 15;

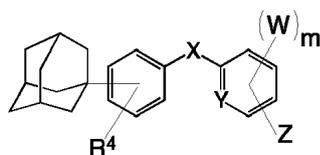
Y es N o CH;

- Z es H, NO<sub>2</sub>, OH, NR<sub>10</sub>R<sub>11</sub> en donde R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H y (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, NHCOR<sub>12</sub> en donde R<sub>12</sub> se selecciona del grupo que consiste en (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, aromático y heteroaromático tal como fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, COOR<sub>13</sub> en donde R<sub>13</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, aromático y heteroaromático tal como fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, NHSO<sub>2</sub>R<sub>14</sub> en donde R<sub>14</sub> se selecciona del grupo que consiste en fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, naftilo, heteroaromático tal como pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 15;



Fórmula III

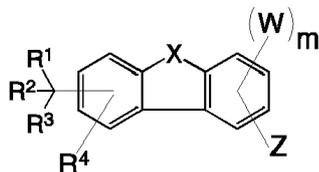
- en donde m es un número entero seleccionado de 1 a 4;
- W se selecciona entre H y halógenos; el halógeno se selecciona de F-, Cl-, Br- o I-;
- R<sub>4</sub>, R<sub>15</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *terc*-butilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> alquenilo, alquinilo; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 15;
- X es O, S, CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, NR<sub>7</sub>, NHCOR<sub>8</sub>, o NHSO<sub>2</sub>R<sub>9</sub>; R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *terc*-butilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>; R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, o heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 15;
- Y es N o CH;
- Z es H, NO<sub>2</sub>, OH, NR<sub>10</sub>R<sub>11</sub> en donde R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, NHCOR<sub>12</sub> en donde R<sub>12</sub> es (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende en fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, COOR<sub>13</sub> en donde R<sub>13</sub> es H, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, NHSO<sub>2</sub>R<sub>14</sub> en donde R<sub>14</sub> es fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, naftilo, heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 15;



Fórmula IV

- en donde m es un número entero seleccionado de 1 a 4;
- W se selecciona entre H y halógenos; el halógeno se selecciona de F-, Cl-, Br- o I-;
- R<sub>4</sub> es H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *terc*-butilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> alquenilo, alquinilo; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 15;
- X es O, S, CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, NR<sub>7</sub>, NHCOR<sub>8</sub>, o NHSO<sub>2</sub>R<sub>9</sub>; R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *terc*-butilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>; R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, o heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 15;
- Y es N o CH;
- Z es H, NO<sub>2</sub>, OH, NR<sub>10</sub>R<sub>11</sub> en donde R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, NHCOR<sub>12</sub> en donde R<sub>12</sub> es (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende en fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, COOR<sub>13</sub> en donde R<sub>13</sub>

es H,  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ , aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo,  $\text{NHSO}_2\text{R}_{14}$  en donde  $\text{R}_{14}$  es fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, naftilo, heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo,  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ , el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 15;



Fórmula V

5

en donde m es un número entero seleccionado de 1 a 4;

W se selecciona entre H y halógenos; el halógeno se selecciona de F-, Cl-, Br- o I-;

R1, R2, R3, R4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *tert*-butilo,  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$  alqueniilo, alquinilo; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 15;

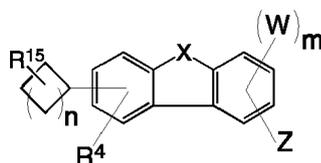
10

X es O, S, CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, NR<sub>7</sub>, NHCOR<sub>8</sub>, o  $\text{NHSO}_2\text{R}_9$ ; R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *tert*-butilo,  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ; R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, o heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo,  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 15;

15

Z es H, NO<sub>2</sub>, OH, NR<sub>10</sub>R<sub>11</sub> en donde R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H y  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ , NHCOR<sub>12</sub> en donde R<sub>12</sub> es  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ , aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, COOR<sub>13</sub> en donde R<sub>13</sub> es H,  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ , aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo,  $\text{NHSO}_2\text{R}_{14}$  en donde R<sub>14</sub> es fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, naftilo, heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo,  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 15;

20



Fórmula VI

25

en donde m es un número entero seleccionado de 1 a 4;

W se selecciona entre H y halógenos; el halógeno se selecciona de F-, Cl-, Br- o I-;

R<sub>4</sub>, R<sub>15</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *tert*-butilo,  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$  alqueniilo, alquinilo; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;

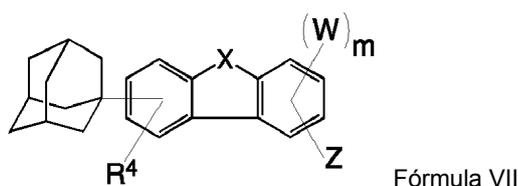
30

X es O, S, CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, NR<sub>7</sub>, NHCOR<sub>8</sub>, o  $\text{NHSO}_2\text{R}_9$ ; R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *tert*-butilo,  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ; R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, o heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo,  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;

35

Z es H, NO<sub>2</sub>, OH, NR<sub>10</sub>R<sub>11</sub> en donde R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H y  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ , NHCOR<sub>12</sub> en donde R<sub>12</sub> es  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ , aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, COOR<sub>13</sub> en donde R<sub>13</sub> es H,  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ , aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo,  $\text{NHSO}_2\text{R}_{14}$  en donde R<sub>14</sub> es fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, naftilo, heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo,  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;

40



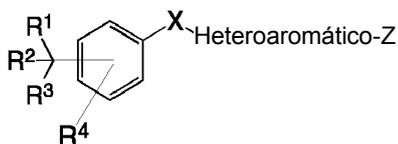
en donde m es un número entero seleccionado de 1 a 3;

W se selecciona entre H y halógenos; el halógeno se selecciona de F-, Cl-, Br- o I-;

5 R4 es H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *terc*-butilo,  $(CH_2)_nCH_3$  alquenilo, alquinilo; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;

10 X es O, S, CR5R6, NR7, NHCOR8, o NHSO<sub>2</sub>R9; R5, R6 y R7 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *terc*-butilo,  $(CH_2)_nCH_3$ ; R8 y R9 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, o heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo,  $(CH_2)_nCH_3$ ; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;

15 Z es H, NO<sub>2</sub>, OH, NR10R11 en donde R10 y R11 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H y  $(CH_2)_nCH_3$ , NHCOR12 en donde R12 es  $(CH_2)_nCH_3$ , aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, COOR13 en donde R13 es H,  $(CH_2)_nCH_3$ , aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, NHSO<sub>2</sub>R14 en donde R14 es fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, naftilo, heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo,  $(CH_2)_nCH_3$ ; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;

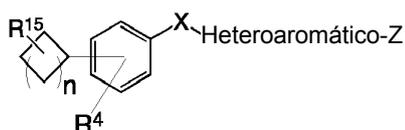


en donde el heteroaromático es un aminopirrol, aminofurano, aminotiofuranilo, o una pirimidina;

R1, R2, R3, R4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *terc*-butilo,  $(CH_2)_nCH_3$  alquenilo, alquinilo; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;

25 X es O, S, CR5R6, NR7, NHCOR8, o NHSO<sub>2</sub>R9; en donde R5, R6, R7, R8, R9 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *terc*-butilo, o  $(CH_2)_nCH_3$ , el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;

30 Z es H, NO<sub>2</sub>, OH, NR10R11 en donde R10 y R11 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H y  $(CH_2)_nCH_3$ , NHCOR12 en donde R12 es  $(CH_2)_nCH_3$ , aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, COOR13 en donde R13 es H,  $(CH_2)_nCH_3$ , aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, NHSO<sub>2</sub>R14 en donde R14 es fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, naftilo, heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo,  $(CH_2)_nCH_3$ ; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;



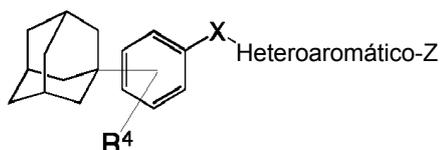
en donde el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 15;

el heteroaromático es un aminopirrol, aminofurano, aminotiofuranilo, o una pirimidina;

40 R4, R15 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *terc*-butilo,  $(CH_2)_nCH_3$  alquenilo, alquinilo; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;

5 X es O, S, CR5R6, NR7, NHCOR8, o NHSO<sub>2</sub>R9; R5, R6 y R7 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *terc*-butilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>; R8 y R9 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, o heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;

10 Z es H, NO<sub>2</sub>, OH, NR10R11 en donde R10 y R11 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H y (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, NHCOR12 en donde R12 es (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, COOR13 en donde R13 es H, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, NHSO<sub>2</sub>R14 en donde R14 es fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, naftilo, heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;



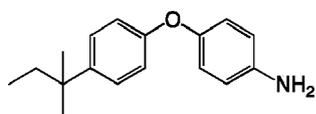
15 en donde el heteroaromático es un aminopirrol, aminofurano, aminotiofuranilo, o una pirimidina;

R4 es H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *terc*-butilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> alquenilo, alquinilo; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;

20 X es O, S, CR5R6, NR7, NHCOR8, o NHSO<sub>2</sub>R9; R5, R6 y R7 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, isopropilo, *terc*-butilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>; R8 y R9 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, 2- o 3-naftilo, o heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;

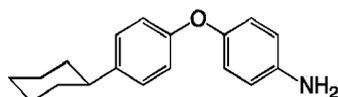
25 Z es H, NO<sub>2</sub>, OH, NR10R11 en donde R10 y R11 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H y (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, NHCOR12 en donde R12 es (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, COOR13 en donde R13 es H, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, aromático y heteroaromático seleccionados del grupo que comprende fenilo, naftilo, pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, NHSO<sub>2</sub>R14 en donde R14 es fenilo, fenilo 2-,3- o 4-sustituido, naftilo, heteroaromático seleccionado del grupo que comprende pirrolilo, furanilo, tiofuranilo, pirimidinilo, imidazolilo, bencilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>; el subíndice n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 15;

También se describen derivados que tienen propiedades de inhibición de la vía de señalización de Notch seleccionados del grupo que consiste en



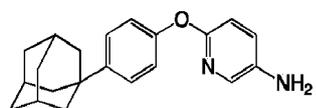
Fórmula II d

35 4-(4-(*terc*-pentil)fenoxi)anilina,



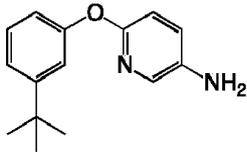
Fórmula III a

4-(4-ciclohexilfenoxi)anilina,



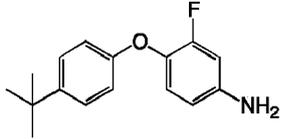
Fórmula IV a

6-(4-((3r,5r,7r)-adamantan-1-il)fenoxi)piridin-3-amina,



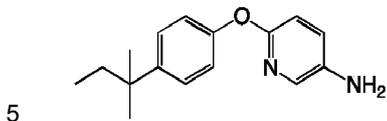
Fórmula II e

6-(3-(*tert*-butil)fenoxi)piridin-3-amina,



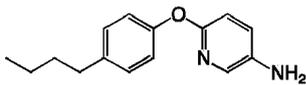
Fórmula II f

4-(4-(*tert*-butil)fenoxi)-3-fluoroanilina,



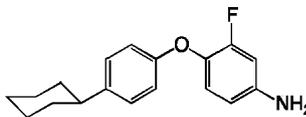
Fórmula II g

6-(4-(*tert*-pentil)fenoxi)piridin-3-amina,



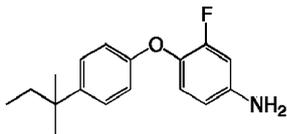
Fórmula II h

6-(4-butilfenoxi)piridin-3-amina,



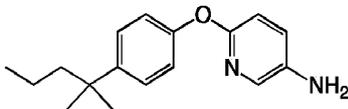
Fórmula III b

10 4-(4-ciclohexilfenoxi)-3-fluoroanilina,



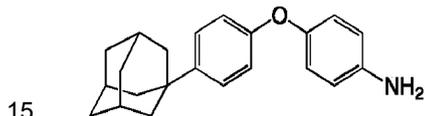
Fórmula II i

3-fluoro-4-(4-(*tert*-pentil)fenoxi)anilina,



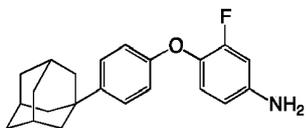
Fórmula II j

6-(4-(2-metilpentan-2-il)fenoxi)piridin-3-amina,



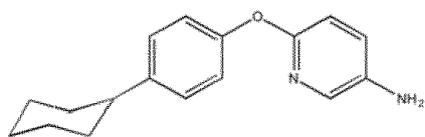
Fórmula IV b

4-(4-((3r,5r,7r)-adamantan-1-il)fenoxi)anilina,



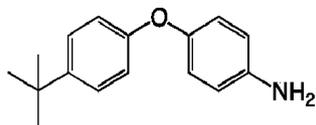
Fórmula IV c

4-(4-((3r,5r,7r)-adamantan-1-il)fenoxi)-3-fluoroanilina,



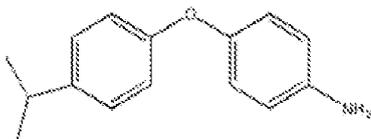
Fórmula III c

6-(4-ciclohexilfenoxi)piridin-3-amina,



Fórmula II k

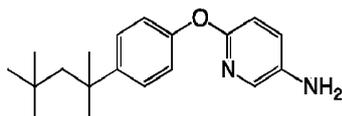
4-(4-*tert*-butil)fenoxi)anilina,



5

Fórmula II l

4-(4-isopropilfenoxi)anilina, y



Fórmula II m

6-(4-(2,4,4-trimetilpentan-2-il)fenoxi)piridin-3-amina.

10 La invención también se refiere a sales o solvatos del compuesto I3, compuestos I3 con modificaciones químicas y derivados de dichos compuestos I3 de la invención. Preferiblemente, estas sales y/o solvatos son farmacéuticamente aceptables. De acuerdo con la presente invención, se producen sales farmacéuticamente aceptables a partir de compuestos ácidos orgánicos e inorgánicos o de compuestos alcalinos orgánicos o inorgánicos. Tal y como se emplea en esta memoria, la frase «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a una sal que conserva la eficacia biológica de los ácidos y las bases libres de un compuesto especificado y que no es indeseable ni desde el punto de vista biológico ni de ningún otro. A menos que se especifique de otra manera, se entiende además que están descritos todos los isómeros, entre ellos los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros y mezclas racémicas del compuesto I3, compuestos I3 con modificaciones químicas y derivados de dichos compuestos I3 de la invención. La invención incluye estereoisómeros en forma ópticamente pura y en mezcla, que incluye las mezclas racémicas. Se pueden preparar isómeros con técnicas convencionales, bien al hacer reaccionar materiales de partida ópticamente puros u ópticamente enriquecidos, o mediante la separación de los isómeros de los compuestos de la presente invención.

«Mezclas racémicas» y «racematos» se refiere a una mezcla de enantiómeros.

25 «Estereoisómero» o «estereoisómeros» hacen referencia a compuestos que difieren en la quiralidad de uno o varios estereocentros. Los estereoisómeros incluyen enantiómeros o diastereoisómeros. El compuesto I3, los compuestos I3 con modificaciones químicas y los derivados de dichos compuestos I3 de esta invención podrían existir en forma estereoisómera si poseen uno o varios centros asimétricos o un doble enlace con sustitución asimétrica y, por lo tanto, se pueden producir como estereoisómeros individuales o como mezclas. A menos que se indique de otra manera, la descripción pretende incluir los estereoisómeros por separado así como las mezclas. Los métodos para determinar la estereoquímica y la separación de los estereoisómeros se conocen bien en la técnica (véase la discusión en el capítulo 4 de *Advanced Organic Chemistry*, 4.<sup>a</sup> ed., J. March, John Wiley and Sons, Nueva York, 1992).

30 «Tautómero» se refiere a las formas alternativas de un compuesto que difieren en la posición de un protón, tal como los tautómeros ceto-enólicos e imina-amina, o las formas tautoméricas de grupos heteroarílicos que contienen un átomo del anillo unido a un resto -NH- en el anillo y un resto =N- en el anillo, tales como pirazoles, imidazoles, bencimidazoles, triazoles y tetrazoles.

40 El experto en la técnica sabrá que si el compuesto I3, los compuestos I3 con modificaciones químicas y los derivados de dichos compuestos I3 de la invención contienen grupos con carga, se obtendrá un ion complementario idóneo a partir de un ácido orgánico o inorgánico. Tales iones complementarios incluyen haluro (tal como cloruro, bromuro, fluoruro, yoduro), sulfato, fosfato, acetato, succinato, citrato, lactato, maleato, fumarato, palmitato, colato, glutamato, glutarato, tartrato, estearato, salicilato, metanosulfonato, bencenosulfonato, sorbato, picrato, benzoato,

cinamato y similares. Si el resto polar es un grupo cargado negativamente, se seleccionará un ion complementario idóneo de sodio, amonio, bario, calcio, cobre, hierro, litio, potasio y zinc, y similares.

Sorprendentemente, el compuesto químico 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) fue identificado como un posible inhibidor de Notch. Resulta interesante que se hallara que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) bloquea la activación de la vía mediada por el NICD (figura 1). Debido a su capacidad para atenuar la activación de Notch mediada por el NICD, la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) es capaz de bloquear la proliferación de las líneas celulares de leucemia que sobreexpresan el NICD que son resistentes al DAPT (un inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa, éster *t*-butílico de la *N*-[*N*-(3,5-difluorofenacetil)-*L*-alanil]-(*S*)-fenilglicina) (figura 5). El potencial inhibidor de Notch que posee la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) se confirmó además por el descenso de los genes diana de Notch en las líneas celulares de LLA-T de humano (figura 3) y la micromatriz geneChip de Affymetrix (no se muestran los datos). El hecho de que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) pueda inducir la diferenciación de las células C2C12 en miotubos multinucleados que expresan la CPM validó adicionalmente la función anti-Notch que posee la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) (no se muestran los datos). La inhibición de la vía de Notch provocada por la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) se puede rescatar por la sobreexpresión de MAML1 por encima de determinados niveles. Por ejemplo, la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) era capaz de bloquear la señalización con 800 ng de NICD y 1  $\mu$ g de MAML1 introducidos transitoriamente en las células; sin embargo, cuando la cantidad de MAML1 se incrementó a 3  $\mu$ g, la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) ya no fue capaz de bloquear la activación de la vía (figura 2). Estos datos sugieren que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) puede interferir con el complejo de activación transcripcional de Notch, con lo que se inhibe la activación de la señalización. Los estudios al microscopio mediante la introducción de MAML a una cantidad en donde la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) pueda seguir bloqueando la activación de la vía demostraron que el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no impide la colocalización de NICD, MAML1 y CSL/RBP-jk en los compartimentos subnucleares (no se muestran los datos). Sin comprometerse con la teoría, uno de los posibles mecanismos de acción de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) podría ser la interrupción de la atracción de los coactivadores transcripcionales hacia el corazón del complejo CSL/RBP-jk-NICD-MAML1. Por lo tanto, todavía queda por determinar el estado de los otros coactivadores implicados en la formación del complejo de activación transcripcional funcional. Cuando hay afecciones fisiológicas, después de la formación del complejo CSL/RBP-jk-NICD-MAML1, la histona acetiltransferasa (HAT) de CBP/p300 se atrae hacia el complejo, lo que conduce a su autoacetilación y a la acetilación de la histona 3 y la 4.

La 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3), así como los derivados de la misma, se estudiaron adicionalmente en un contexto *in vivo* para determinar los efectos secundarios tóxicos así como los efectos inhibidores de Notch en los ratones. La señalización de Notch es esencial para el mantenimiento de la homeostasia normal en el intestino. La eliminación genética o la inhibición farmacológica de la señalización de Notch1 y Notch2 en el intestino conduce a la metaplasia de células calciformes en el intestino. Ya que se ha observado que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) bloquea la señalización mediada por Notch1 y Notch2, los ratones tratados con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) se espera que desarrollen una metaplasia de células calciformes. Lo sorprendente fue que el tratamiento de los ratones con 25 mg/kg de 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) durante 7 días (más de un mes en el caso de los xenotrasplantes) no alteró la homeostasia intestinal y no se manifestó ninguna acumulación de células calciformes (no se muestran los datos). Este resultado inesperado se podía deber a dos razones. Una explicación posible podía ser que la concentración utilizada (25 mg/kg) de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no era suficiente para bloquear la activación de la vía de Notch en el intestino. Sin embargo, una segunda explicación más plausible podía encontrarse en la diferente composición de los complejos de activación transcripcional vía abajo de la señalización de Notch1 y Notch2. Debido a estas posibles diferencias, la señalización mediada por Notch1 y Notch2 podría tener diferentes sensibilidades ante el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3).

La señalización de Notch desempeña una función importante en la regulación del sistema hematopoyético. Por ejemplo, la señalización de DL4-Notch1 es esencial para el desarrollo de los linfocitos T en el timo. La activación de la vía mediada por Notch2 y MAML1 es decisiva para el desarrollo de los linfocitos B de la zona marginal (LBZM) en el bazo. Para inspeccionar si la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) puede comprometer el desarrollo de los LBZM dependientes de Notch en el bazo, los ratones C57B16 se trataron con 25 mg/kg de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) durante 7 días y se analizaron el día 8. Los análisis de citometría de flujo con anticuerpos contra B220, CD21 y CD23 revelaron que el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) provocaba una reducción del porcentaje y del número absoluto de LBZM en el bazo (figura 7).

Se estudió la actividad anticancerosa de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) en modelos de trasplante para enfermedades humanas, a saber, la leucemia de linfocitos T y el cáncer de mama. En estos estudios, la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) ha demostrado una notable capacidad para enlentecer la progresión y la metástasis de la forma muy agresiva de las líneas celulares de leucemia (figura 8). Además, en un estudio preliminar con cáncer de mama como modelo de tumores sólidos, el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) ha conducido a un bloqueo de la progresión del tumor en los ratones (figura 9).

El compuesto químico 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) ha demostrado ser capaz de bloquear la señalización mediada por el NICD. Así pues, este compuesto es útil en los cánceres donde los tumores impulsados por Notch son resistentes al tratamiento con inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa.

La presente invención también da a conocer una composición farmacéutica que comprende la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) de fórmula I, o uno de sus derivados que tiene propiedades de inhibición de la vía de señalización de Notch, tal y como está descrito en la presente memoria, o sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, tautómeros, isómeros de los mismos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En cuanto a los vehículos adecuados, se podría hacer referencia a la bibliografía estándar que los describe, p. ej., al capítulo 25.2 del volumen 5 de «Comprehensive Medicinal Chemistry», Pergamon Press 1990, y a «Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete», de H. P. Fiedler, Editio Cantor, 2002. La terminología «vehículo farmacéuticamente aceptable» significa un vehículo o excipiente que es útil para la preparación de una composición farmacéutica que por lo general resulta segura y que posee una toxicidad aceptable. Los vehículos aceptables incluyen los que son aceptables para el uso veterinario, así como para el uso farmacéutico humano. Un «vehículo farmacéuticamente aceptable», tal y como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluye tanto uno como más de uno de tales vehículos. Opcionalmente, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además uno o varios agentes activos adicionales seleccionados del grupo no limitante que comprende agentes quimioterápicos para el tratamiento del cáncer. Tales agentes quimioterápicos se podrían seleccionar del grupo que comprende, por ejemplo, altretamina, bleomicina, busulfano, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, crisantaspa, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, etopósido, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, oxaliplatino, pentostatina, procarbazona, estreptozocina, tamo, temozolomida, tioguanina, tiotepa, topotecán, treosulfano, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.

Los compuestos de la invención, a saber la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y los derivados de la misma, que se utilizan para el tratamiento y/o la prevención de cánceres, se pueden incorporar en numerosas formulaciones y medicamentos para la administración terapéutica. Más en particular, uno o varios compuestos tal y como se dan a conocer en la presente memoria se pueden formular en composiciones farmacéuticas por combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables y adecuados, y se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, grajeas, geles, suspensiones lechosas, ungüentos, soluciones, supositorios, inyecciones, inhaladores y aerosoles. Como tal, la administración de los compuestos se puede conseguir de diferentes maneras, que incluyen la administración oral, yugal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intracraneal y/o intratraqueal. Además, el compuesto se puede administrar de una manera local en vez de sistémica, en una formulación de efecto prolongado o de liberación lenta. Los compuestos se pueden formular con excipientes, diluyentes o vehículos corrientes, y comprimirse en comprimidos, o formularse como elixires o soluciones para la administración oral cómoda, o administrarse por las vías intramuscular o intravenosa. Los compuestos se pueden administrar por vía transdérmica y se pueden formular como formas farmacéuticas de liberación lenta y similares. Los compuestos se pueden administrar solos, en politerapia con ellos mismos, o se pueden utilizar en politerapia con otros compuestos conocidos. Las formulaciones idóneas para usos en la presente invención se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company (1985), Filadelfia, PA, 17.<sup>a</sup> ed.), que se incorpora en la presente memoria por referencia. Además, para una revisión breve de los métodos para la administración de los fármacos, véase Langer, *Science* (1990) 249: 1527-1533, que se incorpora en la presente memoria por referencia.

La cantidad de un compuesto tal y como se da a conocer en la presente memoria que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma farmacéutica de dosis unitaria variará en función de la enfermedad tratada, del sujeto que la necesita, y del modo concreto de administración. Sin embargo, a modo de guía general, las dosis unitarias idóneas para los compuestos de la presente invención pueden, por ejemplo, contener preferiblemente entre 0,1 mg y aproximadamente 1000 mg, entre 1 mg y aproximadamente 500 mg, y entre 1 mg y aproximadamente 300 mg del compuesto activo. En otro ejemplo, la dosis unitaria está entre 1 mg y aproximadamente 100 mg. Tales dosis unitarias se pueden administrar más de una vez al día, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 veces al día, pero preferiblemente 1 o 2 veces al día, de tal forma que la dosis total para un adulto humano de 70 kg está en el margen de 0,001 a aproximadamente 15 mg por kilogramo de peso del sujeto por administración. Una dosis preferida es de 0,01 a aproximadamente 1,5 mg por kilogramo de peso del sujeto por administración, y tal terapia se puede extender durante numerosas semanas o meses y, en algunos casos, años. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específica para cualquier paciente concreto dependerá de una serie de factores, entre ellos la actividad del compuesto específico empleado; la edad, la masa corporal, el salud general, el sexo y la dieta del individuo que se ha de tratar; el momento y la vía de administración; la velocidad de excreción; otros fármacos que se hayan administrado anteriormente; y la intensidad de la enfermedad concreta que se somete al tratamiento, como entiende bien el experto en el campo de la técnica. Una dosis típica puede ser de comprimidos de 1 mg a aproximadamente 100 mg, o de 1 mg a aproximadamente 300 mg, que se toman una vez al día o varias veces al día, o una cápsula o comprimido de liberación prolongada que se toma una vez al día y que contiene una cantidad proporcionalmente más alta del ingrediente activo. El efecto de liberación con el tiempo se puede obtener mediante cápsulas de materiales que se disuelven a diferentes valores de pH, mediante cápsulas que se liberan lentamente por presión osmótica, o mediante cualquier otro medio conocido de liberación controlada. Puede ser necesario utilizar dosis fuera de estos márgenes en algunos casos, como resultará evidente para los expertos en la técnica.

La presente invención da a conocer además un compuesto de la invención para uso para el tratamiento y/o

prevención de cánceres.

Tal y como se emplea en esta memoria, el cáncer es un cáncer dependiente de Notch y se selecciona del grupo no limitante que comprende leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (LLA-T), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma de células de Mantle, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, melanoma, tumores de cerebro, angiogénesis tumoral y cáncer colorrectal.

Preferiblemente, los compuestos de la presente invención (6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3), sus derivados) también se pueden utilizar para el tratamiento del cáncer, en donde el cáncer dependiente de Notch es resistente al tratamiento con inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa. Los tumores humanos dependientes de la señalización de Notch que son resistentes al tratamiento con inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa se pueden determinar por la concentración del NICD, de genes diana de Notch, así como por las mutaciones que acumulen el receptor Notch y otros componentes de la vía de Notch.

La presente invención también da a conocer un método para el tratamiento y/o prevención del cáncer, en donde dicho método comprende la administración de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3), sus derivados, o la composición farmacéutica de la invención, a un sujeto que lo necesita.

En otra realización, la presente invención da a conocer un método para el tratamiento de una enfermedad asociada a la inducción de la actividad de la vía de señalización de Notch, en donde dicho método comprende la administración de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3), un derivado de la misma, o la composición farmacéutica de la invención, a un sujeto que lo necesita.

La dosis diaria de los compuestos de la presente invención variará necesariamente según el huésped tratado, la vía de administración concreta, y la intensidad y tipo de la enfermedad a tratar. Por consiguiente, la dosis óptima la podría determinar el médico que está tratando a un paciente concreto. Además, se observa que el facultativo o médico que lo trata sabrá cómo y cuándo comenzar, interrumpir, ajustar o terminar el tratamiento en función de la respuesta de cada paciente.

Para cualquier compuesto utilizado en el método de la presente invención, se puede estimar inicialmente una dosis terapéuticamente eficaz a partir de los ensayos de cultivos celulares, de los modelos de animales o de la microdosificación de los pacientes humanos.

«Tratamiento», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. En los sujetos que necesitan el tratamiento están incluidos los que ya tienen el trastorno, tal como un cáncer, así como aquéllos en los que el trastorno, tal como un cáncer, se ha de prevenir. Por lo tanto, el mamífero, preferiblemente humano, a tratarse en la presente memoria podría haberse diagnosticado que tenía el trastorno, tal como cáncer, o que podría estar predispuesto o ser susceptible al trastorno, tal como cáncer.

La terminología «cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a una cantidad de un fármaco que es eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco podría reducir el número de tumores o de células cancerosas, reducir el tamaño de los tumores; inhibir (a saber, enlentecer en cierta medida y preferiblemente detener) la infiltración de las células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (a saber, enlentecer en cierta medida y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o varios de los síntomas asociados al cáncer. En la medida en que los compuestos de la presente invención podrían impedir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, podría ser citostático y/o citotóxico. La frase «cantidad terapéuticamente eficaz» se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a una cantidad suficiente para prevenir o, preferiblemente, reducir hasta al menos aproximadamente el 30%, preferiblemente hasta al menos el 50%, preferiblemente hasta al menos el 70%, preferiblemente hasta al menos el 80%, preferiblemente hasta al menos el 90%, un cambio significativo desde el punto de vista clínico en el crecimiento o la progresión o la actividad mitótica de una masa celular, de un grupo de células cancerosas, o de otro rasgo de enfermedad, que se desea tratar.

Opcionalmente, los compuestos de la presente invención se podrían utilizar contra las enfermedades proliferativas celulares en politerapia (por ejemplo, al mismo tiempo, o casi al mismo tiempo, o una después de la otra) con tratamientos convencionales, tales como la radioterapia estándar y/o la quimioterapia estándar. La radioterapia y la quimioterapia estándares también pueden ser la quimiorradioterapia concomitante.

Así pues, opcionalmente, la radioterapia y/o quimioterapia estándares se pueden realizar antes, a la vez o después de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la presente invención, o de las composiciones farmacéuticas que lo contienen.

La terminología «quimiorradioterapia concomitante» se utiliza cuando estos dos tratamientos (quimioterapia y radioterapia) se dan al mismo tiempo o bien casi al mismo tiempo, por ejemplo, una después de la otra, o el mismo día, etc.

La terminología «radioterapia estándar» se refiere al uso de la radiación ionizante como parte del tratamiento contra el cáncer para controlar las células malignas. Preferiblemente, la radiación ionizante es la radiación  $\gamma$ . También es

habitual combinar la radioterapia con cirugía, quimioterapia, tratamiento hormonal, o combinaciones de los mismos. Los tipos de cáncer más habituales se pueden tratar normalmente con radioterapia. La determinación del tratamiento exacto (curativo, adyuvante, neoadyuvante o paliativo) dependerá del tipo, de la localización y del estadio del tumor, así como de la salud general del sujeto que lo necesita.

5 La terminología «quimioterapia estándar» se refiere por lo general a un tratamiento de un cáncer que utiliza quimioterápicos o sustancias químicas específicos. Un quimioterápico se refiere a una sustancia farmacéutica utilizada por lo general para el tratamiento del cáncer. Los quimioterápicos para tratar el cáncer incluyen, por ejemplo, altretamina, bleomicina, busulfano, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, crisantaspa, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, etopósido, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, oxaliplatino, pentostatina, procarbazona, estreptozocina, taco, temozolomida, tioguanina, tiotepa, topotecán, treosulfano, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.

10 Cuando se utiliza un quimioterápico en politerapia con un compuesto de acuerdo con la presente invención, entonces se podría utilizar en forma de un medicamento que contiene una combinación de estos dos agentes, para la administración simultánea, o se pueden utilizar en forma de formas farmacéuticas independientes, en donde cada una contiene uno de los agentes, y en el último caso, cada una de las formas farmacéuticas se puede utilizar, p. ej., secuencialmente, a saber, una forma farmacéutica con el compuesto de la invención seguida de una forma farmacéutica que contiene el quimioterápico (o viceversa). Esta realización de dos formas farmacéuticas independientes se podría concebir y dar a conocer en la forma de un kit.

15 También opcionalmente, los compuestos de la presente invención se podrían utilizar contra enfermedades celulares proliferativas, tales como las neoplasias, en combinación con la retirada convencional de una masa tumoral, por ejemplo, por extirpación segmentaria (biopsia o extirpación macroscópica).

20 La terminología «retirada de una masa tumoral» se refiere a cualquier retirada, ablación o extirpación de una masa tumoral de un sujeto. La retirada puede ser química, con radiación o quirúrgica. Preferiblemente, dicha retirada es quirúrgica, tal como la ablación o la extirpación. La extirpación puede ser «extirpación segmentaria» (o segmentectomía), un procedimiento quirúrgico para retirar parte de un órgano o glándula de un sujeto. Se podría utilizar para retirar un tumor y el tejido normal que lo rodea. El agente citorreductor se podría utilizar también para retirar la masa tumoral. La terminología «agente citorreductor» incluye cualquier molécula (p. ej., química, biológica) o cualquier agente externo/ambiental (p. ej., radiación  $\gamma$ ) o cirugía tradicional que permitiría destruir las células cancerosas de la masa tumoral (p. ej. células FL1<sup>0</sup> y FL1<sup>-</sup> tal y como se mencionó más arriba).

25 Otro objeto de la presente invención es un kit que comprende una o varias dosis de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3), o de uno de sus derivados que tenga propiedades de inhibición de la vía de señalización de Notch, o la composición farmacéutica de la presente invención, para usos en un método para el tratamiento y/o la prevención del cáncer. El kit puede comprender además una o varias dosis de un quimioterápico. Opcionalmente, el kit podría comprender también reactivos y/o instrucciones de uso.

30 Por lo general, el kit comprende un envase y una etiqueta o prospecto en el envase o asociado a este. Los envases idóneos incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los envases podrían estar formados por muy diversos materiales, tales como vidrio o plástico. El envase aloja la composición farmacéutica que es eficaz para el tratamiento de la afección y podría tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor podría ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforar una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para tratar la afección elegida, tal como cáncer.

35 La presente invención también se refiere al uso de los compuestos de la invención para inhibir *in vitro* o *in vivo* la vía de señalización de Notch en las células. Lo normal es que dichas células sean células cancerosas.

40 También se contempla un método para el tratamiento de un sujeto contra un cáncer dependiente de Notch, que comprende

45 i) determinar en las células cancerosas obtenidas de una muestra biológica de dicho sujeto si el cáncer es dependiente de la vía de señalización de Notch, y ii) tratar a dicho sujeto en función de si el cáncer es dependiente de Notch mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) de fórmula I o uno de sus derivados que tiene propiedades de inhibición de la vía de señalización de Notch, o una composición farmacéutica de la invención.

50 Lo normal es que la dependencia de la vía de señalización de Notch en las células cancerosas se determine por cualquier método conocido en la técnica. A modo de ejemplo, este método puede consistir en ensayos de la actividad del complejo de la  $\gamma$ -secretasa *in vitro* tal y como está descrito en la presente memoria.

55 Este método de tratamiento podría comprender además la administración de al menos un tratamiento convencional contra el cáncer. El tratamiento convencional contra el cáncer se administra antes, a la vez, o después de la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) de fórmula I, o de uno de sus derivados que tiene propiedades de inhibición de la vía de señalización de Notch, o la composición

farmacéutica de la invención.

Lo normal es que el tratamiento convencional contra el cáncer consista en radioterapia y/o quimioterapia.

La presente invención también se refiere al uso de los compuestos de la invención en un método para provocar la apoptosis en una célula, *in vitro* o bien *in vivo*, mediante la inducción de la parada del ciclo celular en G0/G1.

- 5 Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en la presente memoria es susceptible a variaciones y modificaciones diferentes de las específicamente descritas. La invención también incluye todas las etapas, peculiaridades, composiciones y compuestos citados o indicados en esta memoria descriptiva, de forma individual o colectiva, y cualquiera y todas las combinaciones, o cualesquiera dos o más de dichas etapas o peculiaridades. La presente descripción se considera, por lo tanto, en todos los aspectos, como ilustrativa y no restrictiva, pues el alcance de la invención está indicado por las reivindicaciones adjuntas.

La descripción anterior se entenderá mejor con referencia a los ejemplos que vienen a continuación. Tales ejemplos son ejemplares de los métodos de puesta en práctica de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

- 15 Construcciones y ensayos con gen indicador:

El ADNc de DL4-IRES dsRED de ratón se clonó en un vector pENTR1 (Invitrogen®) y finalmente se transbordó a un vector lentivírico de destino mediante una estrategia de clonación Gateway (Invitrogen). Un promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK) impulsó la expresión de la proteína DL4. Se produjeron partículas lentivíricas con DL4 en las células 293T mediante la cotransfección del vector lentivírico con DL4, el plásmido de expresión con Gag/pol y el plásmido que codifica las proteínas de la envoltura del virus. Para sobreexpresar la proteína Notch1, se clonó el ADNc completo de Notch1 de ratón en un vector pCDNA3.1-IRES-puromicina. El ADNc de Notch1 se clonó delante de la IRES-puromicina entre los sitios de restricción HindIII y XbaI. Un promotor de CMV controló la expresión de la proteína Notch1.

- 25 Para medir la activación de la señalización de Notch, se clonaron las secuencias de fijación al ADN de consenso de CSL/RBP-jk en una conformación de cabeza a cola en el vector pGL4 con luciferasa (Promega), con lo que se le denominó vector 12xCSL/RBP-jjk con luciferasa. Para determinar la activación de la vía de Notch en el ensayo de cribado de compuestos químicos, las secuencias consenso de fijación al ADN de 12xCSL/RBP-jk se clonaron en el vector pGL4.26.luciferasa (Promega). Como control interno para la eficacia de la transfección, se utilizó el vector con SV40 para *Renilla* (Promega).

- 30 Se realizaron estudios de la sobreexpresión de NICD-GFP con el plásmido de expresión pEGFP-C1-NICD. El plásmido FLAG-CMV2 que expresa MAML1-FLAG fue una generosa donación del Dr. Lizi Wu de la Facultad de Medicina de Harvard, Boston.

Generación de células HeLa estables con DL4 y N1:

- 35 Para generar líneas celulares estables con DL4 y N1, las células HeLa se compraron a la ATCC (n.º de catálogo CCL-2). Para generar las líneas estables con DL4, las células se transdujeron con partículas lentivíricas con DL4. Se seleccionaron con puromicina los clones estables con DL4. Los clones que expresan gran cantidad de DL4 se clasificaron con los anticuerpos contra DL4 mediante un clasificador de células activadas fluorescentes (FACS). Para generar la línea estable con N1, las células se transfectaron con un plásmido pCDNA3.1+ (Invitrogen) que contenía la Notch1 completa de ratón bajo el control del promotor de CMV. Para seleccionar los clones que expresan Notch1, se clonó un casete de IRES-puromicina detrás del ADNc de Notch1. Las células HeLa que expresan Notch1 en gran cantidad se enriquecieron mediante FACS con anticuerpos anti-Notch1. Las células DL4-HeLa y N1-HeLa se cultivaron en DMEM (GIBCO, Invitrogen). con STF al 10% y 10 µg/ml de puromicina (Sigma).

Cribado masivo y análisis de datos:

- 45 Para el cribado de la quimioteca, se llevó a cabo el ensayo de cocultivo tal y como se describe a continuación. Las células N1-HeLa se cotransfectaron en placas de cultivo de tejidos de 10 cm con 16 µg del vector pGL4.26.12xCSL.luciferasa por placa, 4 µg del plásmido de expresión de Notch1 por placa y 200 ng del vector con SV40 para *Renilla* por placa. Se utilizó EDTA a 0,5 mM (PBS a 1×) para despegar las células de DL4-HeLa y N1-HeLa de la placa. Se contaron ambas poblaciones de células y se mezclaron en una proporción 1:1 (5000:5000 células/pocillo en una placa de 384 pocillos), y se dispensaron en placas de 384 pocillos (fondo blanco transparente, Corning) mediante el dispensador de placas Multidrop Combi. En las placas del ensayo se dispensaron previamente (con un manipulador automático de líquido Biomek 3000) las quimiotecas (Microsource NIMDS, Maybridge Hitfinder y Prestwick) para dar una concentración final de 10 µM. El volumen final del ensayo fue de 22 µl. Se aspiró el medio de crecimiento 24 horas después y se lisaron las células con tampón de lisis Passive a 1× durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se midió la actividad luciferasa con el reactivo de ensayo II para la luciferasa y se

determinaron los valores de *Renilla* mediante el reactivo Stop and Glow (sistema de ensayo dual de la luciferasa, n.º de catálogo E1980, Promega). Se tomaron las lecturas de luciferasa y *Renilla* con un lector multiplacas Tecan® F500 (Tecan). Todas las etapas de manejo de líquido (aspiración del medio, dispensación del tampón de lisis Passive, reactivo del ensayo II para la luciferasa y reactivo Stop and Glow) se realizaron con el manipulador de líquidos ELF406.

Los análisis de datos se realizaron con el programa informático de análisis elaborado por los autores en la Instalación de Cribado Biomolecular (BSF, por su nombre en inglés) de la Escuela Politécnica Federal de Lausanne (EPFL, por su nombre en francés).

#### Extracción del ARN

El ARN total se extrajo de las células con el kit de extracción TRIzol® (Invitrogen). Brevemente,  $1 \times 10^6$  células se lavaron con PBS a 1× enfría en hielo y se lisaron en 1 ml de la solución de TRIzol® durante 5 minutos a temperatura ambiente para disociar los complejos nucleoproteicos. A continuación, las células lisadas se trataron con 200 µl de cloroformo y se agitaron vigorosamente durante 15 a 30 s, y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 o 3 min. Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm con una centrifuga de sobremesa Eppendorf durante 10 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación, la fase acuosa superior se transfirió a nuevos tubos Eppendorf. Para precipitar el ARN total, se le añadieron 500 µl de alcohol isoamílico a la fase acuosa separada y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se obtuvo un sedimento de ARN al centrifugar las muestras a 4 °C durante 10 minutos. El sedimento de ARN obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 75% enfría en hielo y se centrifugó brevemente a 14.000 rpm a 4 °C. El sedimento de ARN se secó del exceso de etanol y se resuspendió en 40 µl de agua tratada con DEPC.

#### Síntesis del ADNc:

El ARN total extraído de las células se utilizó para sintetizar ADNc mediante la reacción de transcripción inversa. La transcripción inversa se realizó con la SuperScript™ RT (Invitrogen). La concentración del ARN se midió con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Witec AG) y 500 ng del ARN total se mezclaron con una mezcla a 10 mM de dNTP y 100 ng de los cebadores aleatorios. La mezcla de reacción se incubó a 65 °C durante 5 minutos y se incubó en hielo rápidamente durante 1 minuto. Después de la incubación en hielo, se le añadieron el tampón de la primera hebra a 5× y DTT a 0,1 M, y la mezcla se incubó durante 2 minutos a 25 °C. Para empezar la reacción de transcripción inversa, se le añadieron 200 U de SuperScript™ II RT a la mezcla de reacción y se incubó a 42 °C durante 50 minutos. La reacción se paró mediante la incubación de la mezcla de reacción a 75 °C durante 15 minutos.

#### Análisis por inmunotransferencia de tipo Western:

Las células se lisaron en el tampón RIPA (Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, NaCl a 150 mM, nonidet P-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5% y SDS al 0,1%) durante 30 minutos a 4 °C. Las células lisadas se centrifugaron para retirar los residuos a 14.000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf. Se determinó la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford con un espectrofotómetro (Ultrospec 3000 pro). Se desnaturalizaron 40 µg de proteínas en el tampón de carga para gel de SDS a 1× (Tris-HCl a 100 mM, pH 6,8, DTT a 200 mM, SDS al 4%, bromofenol al 0,2%, glicerol al 20%) al calentarlas a 99 °C durante 5 minutos. Las muestras de proteínas desnaturalizadas se conservaron en hielo hasta la carga en el gel de acrilamida. Las muestras se migraron en un gel de acrilamida al 8% o 10% en el tampón de electroforesis de Tris-glicina (Tris a 25 mM, glicina a 250 mM, SDS al 0,1%). Después de la separación en el gel de acrilamida, las muestras de proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (PEQ Lab, número de catálogo 39-3010) con el tampón de transferencia (glicina a 39 mM, Tris base a 48 mM, SDS al 0,037% y metanol al 20%).

Para la inmunotransferencia, las membranas se bloquearon con leche al 5% y se incubaron durante una noche con el anticuerpo primario a 4 °C. La membrana se lavó con TBST a 1× (TBS a 1× y Tween 20 al 0,5%) durante 5 minutos (3 veces), y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a la HRP durante una hora a temperatura ambiente. La señal se detectó con el sustrato quimioluminiscente Super Signal West (Thermo Scientific, número de catálogo 34077).

#### Tinción por inmunofluorescencia:

Para realizar la tinción por inmunofluorescencia, las células HeLa o las células C2C12 se hicieron crecer en cubreobjetos. Las células se lavaron con PBS a 1× enfría en hielo, se fijaron con PFA al 4% durante 5 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,3%. Posteriormente, las células permeabilizadas se bloquearon durante 20 minutos con SAB al 1% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios adecuados para uno a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor-488 para detectar los anticuerpos primarios. Las células se contratiñeron con DAPI y se montaron en un medio de montaje fluorescente. Las imágenes fluorescentes se visualizaron y capturaron al microscopio Zeiss Axioplan en Bioimaging y en la instalación central de óptica del EPFL.

Tabla 1: Lista de los anticuerpos y diluciones de trabajo

Anticuerpos	Aplicación	Dilución	Procedencia
Anti-Val 1744 NICD	ITW y CHIP	1:1000	Cell Signal, 2421S
Anti-Notch1 (C-20)	ITW	1:1000	Santa Cruz, sc-6014
Anti-RBP-jk	IF	1:500	Santa Cruz, sc-28713
Anti-FLAG-M2	IF	1:500	Sigma, F1804
Anti-Hes1 (H-140)	ITW	1:500	Santa Cruz, sc-25392
Anti-cMyc (9E10)	ITW	1:500	Abcam, ab11917
Anti-Delta like 4	Citometría de flujo	1:100	Producción interna
Anti-Notch1	Citometría de flujo	1:50	Producción interna
Antitubulina	ITW	1:3000	Sigma,
Anti-cadena pesada de la miosina	IF	1:200	Sigma, MY-32
Anti-IgG de cabra conjugado con HRP	ITW	1:3000	Invitrogen, 611620
Anti-IgG de ratón conjugado con HRP	ITW	1:3000	GE Healthcare, NA931V
Anti-IgG de conejo conjugado con HRP	ITW	1:3000	GE Healthcare, NA934V
Ac. secundario con Alexa Fluor-488	IF	1:1000	Invitrogen
Anti-B220 con azul pacífico	Citometría de flujo	1:400	Producción interna
Anti-CD21 con FITC	Citometría de flujo	1:200	eBioscience
Anti-CD23 con PE	Citometría de flujo	1:400	BD Pharmingen
Anti-TCR $\beta$ de CPA con eF780	Citometría de flujo	1:400	eBioscience
Anti-CD4 con FITC	Citometría de flujo	1:800	Producción interna
Anti-CD8 con Alexa 648	Citometría de flujo	1:600	Producción interna
Anti-CD71 con PE	Citometría de flujo	1:800	eBioscience
Anti-Ter119 de CPA con eF780	Citometría de flujo	1:200	eBioscience
Anti-anexina V con Cy5	Citometría de flujo	1:50	BD Pharmingen

Ensayo de diferenciación de mioblastos de C2C12:

Las células C2C12 se hicieron crecer en un cubreobjetos revestido con colágeno en presencia del medio de crecimiento (suero al 10%). Para inducir la diferenciación de mioblastos, las células se hicieron crecer hasta una confluencia del 100% durante 3 días en presencia del medio de diferenciación (suero de caballo al 2%) o en

presencia del medio de crecimiento con inhibidores de Notch. Después de 3 días, las células se lavaron con PBS a 1× enfriado en hielo y se fijaron con PFA al 4%. La tinción de inmunofluorescencia se realizó con el anticuerpo anti-CPM tal y como está explicado en el apartado 2.2.6 (tinción de inmunofluorescencia).

Análisis por citometría de flujo:

- 5 Los análisis de clasificación de células activadas fluorescentes (FACS) se realizaron en una plataforma instrumental CyAn™ ADP para la citometría de flujo en la instalación central de citometría de flujo del EPFL. Se determinó la expresión de DL4 y de Notch1 en las células DL4-HeLa y N1-HeLa con los anticuerpos anti-DL4 y anti-N1, respectivamente. El desarrollo de los linfocitos T en el timo se estudió con los anticuerpos contra CD4, CD8 y TCRβ. Se siguió el desarrollo de los LBZM con anticuerpos contra B220, CD21 y CD23. Brevemente, se preparó una suspensión de células sueltas del timo y del bazo. Se suspendieron  $1 \times 10^6$  células en 50 µl del medio de tinción (HBSS complementado con NCS al 2% y HEPES a 25 mM) y se tiñeron con las combinaciones adecuadas de anticuerpos por incubación en hielo durante 30 minutos.

- 15 Para cuantificar el porcentaje de células apoptóticas, se realizó la tinción con anexina V y 7AAD. Las células del timo se suspendieron en 300 µl del tampón de fijación de anexina V a 1× (BD Biosciences, San Diego, EE. UU.) y se incubaron con 10 µl del anticuerpo contra la anexina V conjugado a Cy5 y 10 µl de 7AAD (BD Biosciences, San Diego, EE. UU.). Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la FACS con una tinción con anticuerpos durante una hora.

Los análisis de citometría de flujo se realizaron en células vivas mediante la sincronización de la dispersión frontal y la dispersión lateral. Se analizaron los datos mediante el programa informático FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

- 20 Ensayo de proliferación con alamarBlue®:

- Los ensayos de proliferación con alamarBlue® se realizaron para determinar la cinética de crecimiento de las células tratadas con el inhibidor de Notch. El alamarBlue® consiste en una resazurina de sustrato permeable a las células. En células metabólicamente activas y en proliferación, la resazurina se convierte en resorufina debido a un poder reductor intrínseco de las células vivas y produce una fluorescencia roja. Así pues, la producción de resorufina sirve como indicador de la viabilidad de la población celular.

- Los ensayos de proliferación se llevaron a cabo mediante la inoculación de 5000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se trataron con DMSO o inhibidores de Notch durante diferentes intervalos de tiempo. Cada tratamiento para cada intervalo de tiempo se llevó a cabo en 8 replicas. Para determinar la cinética de crecimiento, se añadieron 10 µl de alamarBlue® (Invitrogen) a cada pocillo y se incubaron durante 4 horas. Se tomó la lectura de alamarBlue® con un lector multiplaca Tecan F500 (Tecan).

Tinción con hematoxilina y eosina:

- Se recogieron los órganos, se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante una noche a 4 °C y se incluyeron en parafina. Los cortes de tejido se desparafinaron y se hidrataron con concentraciones decrecientes de etanol (100%-70%) y, finalmente, en agua destilada. Los cortes se tiñeron con hematoxilina durante 5 minutos, se enjuagaron en alcohol ácido durante aproximadamente 20 s y entonces se enjuagaron con agua del grifo durante 10 minutos. A continuación, los cortes se tiñeron con eosina durante 5 minutos, se lavaron en agua y se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (70%-100%), y se hicieron transparentes en solución de xileno. Los cortes se montaron mediante la solución de montaje. Se visualizaron los cortes teñidos con hematoxilina y eosina, y las imágenes se capturaron con un microscopio Leica DMI4000.

- 40 Tinción con azul alcian:

- El tejido intestinal se enjuagó con PBS a 1× enfriado en hielo y se fijó en PFA al 4%. Los tejidos se incluyeron en parafina y se cortaron con un grosor de 4 µm. Los cortes intestinales se desparafinaron a 60 °C y se hidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol (100%-70%), y, finalmente, se lavaron en agua destilada. La tinción con azul alcian tuvo lugar durante 30 minutos a temperatura ambiente en agua del grifo y, finalmente, se contratiñó en la solución roja rápida nuclear durante 5 minutos. A continuación, los cortes de tejido se lavaron con agua del grifo, se deshidrataron en alcohol al 100% y se hicieron transparentes en solución de xileno. Los cortes montados se visualizaron después y las imágenes se capturaron con un microscopio Leica DMI4000.

Ratones experimentales:

- Los ratones se mantuvieron y se alimentaron en el animalario del EPFL, Lausanne. Se utilizaron ratones C57B16 para valorar la toxicidad intestinal de los compuestos químicos. Los ratones MMTV-ErbB2/Neu-IRES Cre (acervo genético FVB) se obtuvieron del Dr. William J. Muller, McGill University (Montreal) y se genotiparon con los cebadores específicos del MMTV-ErbB2/Neu (Ursini-Siegel et al., 2008). Los ratones DNO/IDCG  $\gamma c^{-/-}$  se compararon a The Jackson Laboratory (EE. UU.), y se mantuvieron y se alimentaron en el animalario del EPFL, Lausanne.

Toxicidad intestinal y efecto sobre el desarrollo de los linfocitos B en la zona marginal:

A los ratones C57B16 se les inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) aceite o 25 mg/kg de I3 o 10 mg/kg de CPA, una vez al día durante 5 a 7 días. Los ratones se pesaron con una escala de ponderación el día 0, el día 3 y el día 5. El día 8 se recogieron el tejido intestinal, el bazo y el timo para los análisis.

Ensayo de trasplante de tumor:

5 Las líneas celulares de leucemia de humano RPMI 8402 y HPB-ALL se transdujeron con un lentivirus que contenía el gen de la luciferasa expresado constitutivamente detrás de un promotor del CMV. Las líneas celulares de leucemia de humano RPMI 8204 ( $0,5-1 \times 10^6$  células) y HPB-ALL ( $1 \times 10^6$ ) se suspendieron en 100  $\mu$ l de PBS a  $1 \times$  enfriado en hielo y se mantuvieron en hielo hasta el trasplante. A las ratonas DNO/IDCG  $yc^{-/-}$  se les trasplantaron las líneas celulares de leucemia de humano mediante inyección intravenosa (i.v.). Se monitorizó el desarrollo tumoral de las ratonas mediante un sistema de toma de imágenes en vivo Caliper IVIS (Xenogen). Brevemente, la luciferina (Biosynth, L-8820), que es el sustrato de la luciferasa, se disolvió en PBS a  $1 \times$  y se inyectó (por vía intraperitoneal) en las ratonas a una concentración de 150 mg/kg de masa corporal. Se tomaron imágenes de las ratonas durante 5 minutos después de la inyección con luciferina mediante un sistema de toma de imágenes en vivo Caliper IVIS.

10 El día 13-15, las ratonas se trataron con aceite o con 25 mg/kg de I3 cada día. Las imágenes se capturaron al finalizar los experimentos.

15 Se recogieron tumores de mama primarios MMTV-ErbB2/Neu de las ratonas y se preparó una suspensión de células sueltas. Se suspendieron  $1 \times 10^6$  células tumorales primarias en 50  $\mu$ l de PBS a  $1 \times$  y se mantuvieron en hielo. A las ratonas FVB destinatarias de tres semanas de edad se les despojó de su epitelio endógeno y se les inyectaron las células tumorales en la almohadilla de grasa vacía. Se siguió el desarrollo de los tumores en las ratonas destinatarias y se midió el volumen de los tumores con un calibrador digital. El volumen de los tumores se calculó con la siguiente fórmula:  $2 \times \text{longitud} \times (\text{anchura})^2$ . Una vez que el tumor había alcanzado un volumen de aproximadamente 100  $\text{mm}^3$ , las ratonas destinatarias se trataron con aceite o con 25 mg/kg de I3 en días alternos.

Desarrollo del ensayo

25 Para identificar nuevos moduladores de la vía de Notch, los solicitantes han establecido un ensayo de cocultivo en donde las células HeLa que expresan el ligando DL4 se cultivaron con las células HeLa que expresaban N1, con lo que se activaba la vía de Notch. El uso de un sistema de cocultivo de células DL4-HeLa y N1-HeLa imita el estado fisiológico de una comunicación de célula a célula entre las células que expresan el ligando y las que expresan el receptor. La generación *in vitro* de un sistema de ensayo receptor-ligando controlado permitió a los solicitantes modificar y seguir la intensidad de la señal de Notch mediante los inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa.

30 El cocultivo de células HeLa DL4:N1 activa la señalización de Notch

35 Para configurar un ensayo de cocultivo, los solicitantes han consolidado líneas de células HeLa estables que expresan DL4 y N1. Brevemente, las células HeLa se transdujeron con un lentivirus que contenía el ADNc de DL4 detrás del promotor de PGK. La población se enriqueció en las células que expresaban D4 mediante la clasificación de células activadas fluorescentes. De igual forma, la línea de células HeLa estables para N1 se consolidaron con un plásmido que contenía el ADNc de N1 de ratón seguido por un casete de selección con IRES y puromicina. Este sistema permitió a los solicitantes seleccionar solo los clones que expresaban Notch1 cuando se seleccionaban con puromicina. Los niveles de expresión de las proteínas DL4 y N1 en las correspondientes líneas celulares se detectaron con los anticuerpos anti-DL4 y anti-N1. La cuantificación de la concentración de proteínas por citometría de flujo mostró un alto nivel de expresión de DL4 y N1 en comparación con las células HeLa parentales (no se muestran los datos).

40 Para valorar el potencial de activación de la vía de Notch que tienen las líneas celulares estables, se cocultivaron las células HeLa estables con DL4 y N1 (DL4-HeLa y N1-HeLa, respectivamente) a una proporción 1:1 en una placa de 6 pocillos, y se hicieron crecer hasta la confluencia. Las células cocultivadas se trataron con DMSO o DAPT (10  $\mu$ M) durante 24 horas. Para poder comparar, las células HeLa parentales también se cocultivaron con las células DL4-HeLa y se hicieron crecer en presencia o ausencia de DAPT durante 24 horas. Se realizaron los análisis de inmunotransferencia de tipo Western (ITW) para la forma activa de Notch1 (NICD) con los anticuerpos VAL1744, y revelaron sólo niveles modestos de NICD cuando las células HeLa parentales se cocultivaron con las células DL4-HeLa (no se muestran los datos), lo que explica la poca cantidad de Notch1 endógena en las células HeLa. Por otra parte, en ausencia del ligando (células DL4-HeLa) o en presencia de IGS (DAPT), no se detectó ninguna cantidad de NICD, lo que indica una pérdida de la señalización de Notch (no se muestran los datos). No obstante, los cultivos de las células DL4-HeLa y N1-HeLa revelaron una cantidad significativamente más alta de NICD, que se podía bloquear mediante el tratamiento con DAPT (no se muestran los datos). La introducción transitoria del ADNc completo de Notch1 en las células N1-HeLa reforzó aún más la robustez del ensayo de cocultivo, tal y como estaba indicado por el incremento de la concentración de la proteína NICD (no se muestran los datos). La inhibición de la escisión de N1 con DAPT puede anular el incremento de la actividad de señalización de Notch (no se muestran los datos). Estos resultados confirmaban que en el ensayo de cocultivo de DL4:N1 que responde a la inhibición con IGS se podían conseguir niveles altos de activación de la vía de Notch.

La consolidación del ensayo de cocultivo de DL4:N1 en un formato de placa de 6 pocillos permitió a los solicitantes

valorar la activación de señalización de Notch mediada por la interacción entre receptor y ligando. El tratamiento del sistema de cocultivo con IGS (DAPT) puede bloquear la señalización de Notch impulsada por la interacción entre receptor y ligando.

Consolidación del ensayo compatible con el cribado de alto rendimiento (masivo)

- 5 Inicialmente, el ensayo de cocultivo de DL4:N1 se consolidó en una placa de 6 pocillos. Para ajustarlos a un cribado de alto rendimiento (masivo), el sistema de ensayo se optimizó adicionalmente para trabajar con robustez en un formato de placa de 384 pocillos.

10 El ensayo se redujo paulatinamente a un formato de placa de 384 pocillos para el cribado de colecciones de compuestos químicos. Para conseguirlo, las células N1-HeLa se transfectaron con plásmidos indicadores y un vector de expresión de N1. Doce horas después, los compuestos químicos se dispensaron en una placa de 384 pocillos junto con DMSO y DAPT como controles negativo y positivo. Las células DL4-HeLa y N1-HeLa se mezclaron a una proporción 1:1 (5000:5000 células/pocillo) y se añadieron a las placas de 384 pocillos con un dispensador de placas Multidrop Combi. Se midió la lectura de la luciferasa con un sistema dual de ensayo de la luciferasa. Para optimizar y determinar la reproducibilidad del ensayo, la mitad de la placa se trató con DMSO (192 pocillos) y la segunda mitad se trató con DAPT a 10  $\mu$ M (192 pocillos). El tratamiento con DAPT llevó a una disminución de 10 veces de la activación de la señalización de Notch. El valor de Z' para este ensayo fue de más de 0,5. Un valor de Z' > 0,5 confirma la fiabilidad y reproducibilidad de los ensayos para un campaña masiva.

### Ejemplo 2

*La 6-(4-terc-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) como un nuevo inhibidor de la señalización de Notch*

- 20 La I3 inhibe la activación de la señalización de Notch que está mediada por NICD:

Para validar la actividad inhibidora de Notch y determinar el valor de la CI50 del compuesto I3, se utilizó el sistema de ensayo de cocultivo de DL4:N1. Las células en el ensayo de cocultivo se trataron durante 24 horas con una concentración creciente de I3 (2 a 10  $\mu$ M). Se midió la activación de la vía de Notch con el ensayo de la luciferasa indicadora impulsada por la señalización de Notch. Tal y como se muestra en la figura 1A, la I3 bloquea la señalización de Notch de una manera dependiente de la concentración, con un valor de CI50 en el margen inferior de  $\mu$ M.

30 Para determinar si la sobreexpresión de NICD puede rescatar la inhibición de la señalización de Notch mediada por I3, las células HeLa se cotransfectaron con un plásmido de expresión de NICD y una construcción de la luciferasa 12xCSL. Las células transfectadas se trataron con una concentración creciente de I3 y DAPT. Sorprendentemente, el tratamiento de las células que expresan NICD con I3 pudo bloquear la activación de la vía de una manera dependiente de la dosis, mientras que DAPT no tuvo ningún efecto sobre la activación de la señalización (figura 1B). Este dato sugiere que la inhibición de la vía de Notch que está mediada por I3 se debe a su actividad sobre las etapas posteriores al acontecimiento de escisión de S3.

35 A continuación, los solicitantes investigaron si I3 podía bloquear la activación de la vía a través de otros receptores Notch, o si era específico de la señalización de Notch1. Para abordar esto, se utilizó un ensayo de cocultivo donde la señalización de Notch estaba activada a través de las parejas ligando-receptor DL4:N1 o DL4:N2. En estos dos ensayos de cocultivo, el tratamiento de las células con I3 provocó una inhibición de la señalización de Notch a través tanto de la pareja ligando-receptor DL4:N1 como de la DL4:N2 (figura 1C). De igual forma, la I3 podía también bloquear la activación de la vía debida al dominio intracelular de Notch1 (NICD) y al dominio intracelular de Notch2 (N2-ICD), lo que sugiere que la I3 no es específica de la activación mediada por NICD (figura 1D).

La 6-(4-terc-butilfenoxi)piridin-3-amina no bloquea la localización nuclear de NICD:

45 Los datos *in vitro* de las células HeLa transfectadas con NICD sugerían que la 6-(4-terc-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) bloqueaba la señalización de Notch al actuar en las etapas posteriores al acontecimiento de escisión de S3. Esto plantea varias posibilidades sobre el mecanismo de acción de la 6-(4-terc-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3). Por ejemplo, el tratamiento con la 6-(4-terc-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) podría perturbar la localización nuclear de NICD. Un segundo posible mecanismo de inhibición podría ser la acción selectiva sobre uno o varios componentes independientes del complejo de activación transcripcional en el núcleo. Para analizar si la 6-(4-terc-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) repercute sobre el transporte nuclear de NICD, las células HeLa se transfectaron con una construcción de fusión NICD-GFP y se trataron con DMSO y 6-(4-terc-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3). Esto permitió a los solicitantes seguir el transporte de la proteína de fusión dentro de la célula. En paralelo, la inhibición de la vía mediada por la 6-(4-terc-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) se determinó por la medición de la luciferasa impulsada por Notch (no se muestran los datos). Los estudios al microscopio demostraron que en las células tratadas con DMSO, la proteína de fusión NICD-GFP se trasladaba hasta el núcleo, lo cual no se veía alterado tras el tratamiento con la 6-(4-terc-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) (no se muestran los datos). Estos datos descartan que la exclusión nuclear de NICD sea el mecanismo de acción de la 6-(4-terc-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3).

La sobreexpresión de MAML1 por encima de un determinado umbral puede rescatar la inhibición de la señalización

de Notch inducida por la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3):

Ya que el bloqueo de la señalización de Notch mediado por la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no entraña la exclusión nuclear de NICD, los solicitantes analizaron si la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) bloquea la interacción, y con ello la localización subnuclear, de NICD, MAML1 y CSL-RBP-jk (todas las partes del corazón del complejo de activación transcripcional). Para solucionar esto, las células HeLa se cotransfectaron con 800 ng del plásmido NICD-GFP, 1 µg del vector de expresión MAML1-FLAG, y se hicieron crecer en cubreobjetos. Las células HeLa transfectadas se trataron con DMSO o 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) (10 µM) durante 24 horas. La capacidad que mostró la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) para bloquear la activación de Notch a esta concentración de NICD y MAML1 se verificó mediante la medición de la luciferasa impulsada por Notch (no se muestran los datos). Después del tratamiento, las células se fijaron con PFA al 4%, se bloquearon con SAB al 1% y se tiñeron con anticuerpos contra MAML1 etiquetada con FLAG y CSL-RBP-jk. La proteína de fusión NICD-GFP se visualizó siguiendo el rastro de la proteína GFP. Cuando se expresa sola, la proteína NICD-GFP estaba localizada en el núcleo de una manera difusa, y el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no alteró su localización nuclear. Sin embargo, la sobreexpresión de NICD-GFP y MAML1 condujo a la colocalización de ambas proteínas en compartimentos subnucleares (posiblemente, en cuerpos nucleares). El tratamiento de las células con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no alteró el traslado ni la colocalización de NICD-GFP y MAML1 en el compartimento subnuclear (no se muestran los datos).

De igual forma, se estudió la localización de CSL/RBP-jk mediante anticuerpos específicos contra esta proteína. Tal y como se muestra en la figura 22C, MAML1-FLAG y CSL/RBP-jk se colocalizaban en los compartimentos subnucleares y el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no alteraba su distribución en el núcleo (no se muestran los datos). Estos datos sugieren que el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no altera la colocalización de los componentes del complejo de activación transcripcional de Notch en el núcleo. Sin embargo, todavía queda por estudiar si bloquea la interacción entre diferentes componentes del complejo.

Para investigar más el mecanismo de acción de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3), los solicitantes se preguntaron si la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) podría actuar selectivamente sobre uno de los componentes del complejo de activación transcripcional. La sobreexpresión de esta proteína diana podría secuestrar el compuesto 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y así pues rescatar la inhibición de la vía inducida por la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3). Para abordar esta cuestión, las células HeLa se cotransfectaron con 800 ng del plásmido con NICD-GFP, y con una cantidad creciente (0, 1 y 3 µg) del vector de expresión de MAML1-FLAG. La activación de la vía de Notch se midió al introducir el plásmido con la luciferasa 12xCSL. Tal y como se muestra en la figura 2, en las células HeLa transfectadas con NICD solo, o con NICD más 1 µg de MAML1, el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) puede bloquear la señalización de Notch de una manera dependiente de la concentración. Sin embargo, cuando la cantidad de plásmido con MAML1 se incrementó hasta 3 µg, el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) ya no fue capaz de inhibir la activación de la señalización de Notch (figura 2). Por lo tanto, la sobreexpresión de MAML1 por encima de un determinado umbral podía rescatar la inhibición de la vía de Notch mediada por la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3). Estos datos sugieren que MAML1 podría por sí sola ser la diana del compuesto 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3). Un incremento de la concentración de MAML1 podría ser capaz de secuestrar el inhibidor y, así pues, hacerlo incapaz de bloquear la cascada de señalización.

El tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) disminuye la señalización de Notch en las líneas de células cancerosas de humano:

La activación aberrante de la señalización de Notch desempeña una función importante en el inicio de los tumores y/o el mantenimiento de los cánceres humanos. Para determinar si el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) puede bloquear la señalización de Notch en las células cancerosas humanas, diferentes líneas celulares de cáncer (las líneas celulares de LLA-T RPMI 8402, HPB-ALL, KOPTK1 y la línea celular de cáncer de páncreas PANC1) se trataron con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) durante 24 horas. El efecto sobre la señalización de Notch se determinó con la medida del nivel de expresión de los genes diana de Notch. El tratamiento de las líneas celulares de cáncer de humano (RPMI 8402, HPB-ALL, KOPTK1 y PANC1) con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) durante 24 horas y el posterior análisis de los genes diana de Notch por qRT-PCR o inmunotransferencia de tipo Western demostraron que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) inducía una disminución estadísticamente significativa de los genes diana de Notch, tales como Hes1, cMyc y Dtx1, con respecto a la cantidad de ARNm así como de la proteína (figura 3). El descenso de los genes diana de Notch se correlaciona con la reducción de la cantidad de NICD (figuras 3B, C y D).

Ya que el tratamiento de las líneas celulares de LLA-T y de la línea celular de cáncer de páncreas PANC1 con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) indujo una disminución de la señalización de Notch, los solicitantes se preguntaron si esta inhibición de la vía se traduce en una parada del crecimiento en las células cancerosas. Con este fin, las líneas celulares RPMI 8402, KOPTK1, PANC1 y de melanoma impulsadas por nRas se hicieron crecer en presencia o ausencia de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) durante varios días y se midió su índice proliferativo con el ensayo de alamarBlue®. Además, las líneas celulares RAJI de linfocitos B sin ninguna mutación conocida de Notch se utilizó como control (no se muestran los datos). Tal y como se muestra en la figura 4, el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y el DAPT indujo un bloqueo significativo de la

proliferación en las líneas celulares de LLA-T RPMI 8402, KOPTK1 y en la línea de cáncer de páncreas PANC1. De igual forma, la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) inhibió significativamente el crecimiento de las líneas celulares de melanoma impulsadas por nRas (figura 4). Sin embargo, ni el DAPT ni la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) tenían ningún efecto sobre la proliferación de las células RAJI independientes de Notch (no se muestran los datos).

- 5 La 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina(I3), pero no el DAPT, bloquea la señalización de Notch en las líneas celulares de LLA-T y de cáncer de mama de humanos que sobreexpresan NICD.

La 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) puede bloquear la activación mediada por NICD de la vía de Notch (figura 1). Para determinar si la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) también puede inducir un bloqueo de la proliferación en las células que sobreexpresan el NICD, la línea celular de LLA-T de humanos DND41 (DND41-Parental) se transdujo con un lentivirus que expresaba el NICD para generar la línea celular DND41-NICD. Estas dos líneas celulares se trataron con DMSO, 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y DAPT. El tratamiento de la línea celular DND41-parental con DAPT y 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) condujo a una disminución de Hes1 cuando se comparó con las células tratadas con DMSO. Sin embargo, cuando las células DND41-NICD se trataron con DMSO, 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y DAPT, solo el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3), pero no con el DAPT, provocó una disminución de Hes1 (figura 5A). Además, estas dos líneas celulares también se siguieron durante varios días para vigilar los efectos antiproliferativos de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y el DAPT. Se observó que, mientras que el tratamiento con 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y DAPT ocasionaba un bloqueo significativo de la proliferación en la línea celular DND41-Parental (figura 5B), solo la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) fue capaz de inducir una parada del crecimiento en las células DND41-NICD (figura 5C). Estos datos refuerzan aún más la idea de que el compuesto 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) puede bloquear la activación de la vía mediada por NICD, y la proliferación, en las células cancerosas de humanos.

Para reforzar adicionalmente la idea de que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) puede bloquear la activación de la vía mediada por NICD y la proliferación de las células cancerosas de humanos, se trataron con este compuesto las líneas celulares de cáncer de mama de humano HCC1187. La línea celular HCC1187 alberga una translocación cromosómica SECC22B-Notch2, con lo que genera la forma constitutivamente activa de N2-ICD (figura 5D). Debido a esta mutación, las líneas celulares HCC1187 no responden a los inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa, tal como el DAPT. Tal y como se muestra en la figura 5E, mientras que el tratamiento con el DAPT no inhibía la proliferación de la línea celular HCC1187, el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) inducía significativamente un bloqueo de la proliferación en esta línea celular.

- 30 La 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) induce la parada del ciclo celular en G0/G1 y la apoptosis en las líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T humanos:

Tal y como se muestra en las figuras 4 y 5, el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) de las líneas celulares de leucemia de humanos y de las líneas celulares del cáncer de mama de humanos regula negativamente la proliferación. Esta parada proliferativa mediada por la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) se podía deber a la inducción de la apoptosis o a la parada del ciclo celular durante diferentes fases del ciclo celular. Además, la inhibición de la señalización de Notch mediante los inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa se ha demostrado que induce la parada del ciclo celular en G0/G1 en las líneas celulares de LLA-T de humanos. Por lo tanto, se llevaron a cabo análisis para esclarecer más los mecanismos responsables de la parada proliferativa del ciclo celular y la apoptosis mediadas por la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3). Las líneas celulares de LLA-T de humanos (RPMI 8402, KOPTK1, TALL1, CUTL1 y HPB-ALL) y la línea celular de cáncer de mama de humanos HCC1187 se trataron con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) o DMSO durante 2 días o 7 días. Para estudiar la muerte celular, se realizó la tinción de la anexina V y se determinó la proporción de la población celular apoptótica (positiva para la anexina V) mediante el análisis por citometría de flujo después de 7 días de tratamiento. Tal y como se muestra en la figura 6A, el tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) induce una apoptosis significativa en RPMI 8402, CUTL1, KOPTK1, TALL1 y HPB-ALL. De igual forma, la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina induce la apoptosis en la línea celular de cáncer de mama de humanos HCC1187 (figura 6C).

Además de la inducción de la apoptosis, la parada de la proliferación que se observa en las líneas celulares de leucemia de humanos tratadas con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y la línea celular de cáncer de mama también aparece debida a la parada del ciclo celular en la fase G0/G1 del ciclo celular. Las líneas celulares leucémicas (RPMI 8402, KOPTK1 y TALL1) y las líneas celulares de cáncer de mama se trataron con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) durante 48 horas y se determinó el estado del ciclo celular con Ki67 y la tinción de Hoechst. Tal y como se muestra en la figura 6B y 6D, la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) induce una parada en la fase G0/G1 del ciclo celular, un fenotipo que se suele observar debido a la inhibición de la señalización de Notch.

- 55 La inhibición de la señalización de Notch mediada por la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) induce la diferenciación de mioblastos de C2C12:

Para confirmar adicionalmente el potencial inhibidor de Notch que tiene la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) en diferentes sistemas, se utilizó la diferenciación de mioblastos de C2C12 a modo de ensayo funcional. La activación de la vía de Notch en los mioblastos de C2C12 los mantiene en un estado indiferenciado, mientras que la abolición

de la señalización de Notch induce su diferenciación. Los mioblastos de C2C12 se trataron con DMSO, 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y DAPT, y se hicieron crecer hasta la confluencia del 100% durante 3 días. Al cabo de tres días, se fijaron las células y se tiñeron con anticuerpos contra la proteína de cadena pesada de la miosina (CPM). El núcleo de las células se contratiñó con DAPI. Los mioblastos de C2C12 hechos crecer en presencia de suero al 10% (medio de crecimiento) mantienen su estado indiferenciado, mientras que las células tratadas con DAPT y 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) comenzaron a diferenciarse en miotubos multinucleados positivos para CPM (no se muestran los datos).

La 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no bloquea las cascadas de señalización tras Wnt y Hedgehog

Una de las preocupaciones sobre la actividad del compuesto químico 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) es su especificidad por la vía de señalización de Notch. Para analizar si la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) podía también bloquear otras vías del desarrollo, los solicitantes han analizado su capacidad para bloquear las vías de señalización de Wnt y Hedgehog. En resumen, para medir la señalización de Wnt, las células HeLa se transfectaron con un plásmido que contenía un promotor que consiste en los sitios de fijación de TCF/LEF y mediante los cuales se impulsa la expresión de un gen de la luciferasa (TOP-luciferasa). Para activar la vía de Wnt, un plásmido que codifica la  $\beta$ -catenina se cotransfectó en las células HeLa. Las células cotransfectadas se incubaron en presencia o ausencia del compuesto químico 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3). La introducción transitoria de la  $\beta$ -catenina conduce a la inducción de la señalización de Wnt tal y como se mide mediante la actividad de la luciferasa impulsada por la  $\beta$ -catenina-TCF/LEF. Es importante que el tratamiento de las células que tienen activada la señalización de Wnt con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no bloquea la activación de la vía de Wnt (no se muestran los datos).

Con una estrategia similar, la señalización de Hedgehog se activó en las células HeLa mediante la introducción del factor de transcripción Gli1 y se siguió la activación de la vía mediante una secuencia del promotor que contiene los sitios de fijación de Gli1 que impulsan la expresión de la luciferasa. El tratamiento de estas células con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no inhibía la cascada de señalización de Hedgehog (no se muestran los datos). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que el compuesto químico 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no podría alterar otras vías del desarrollo y podría ser específico para la inhibición de la señalización de Notch. Sin embargo, todavía se ha de determinar si la resistencia de la señalización de Wnt y Hedgehog hacia la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) es específica del tipo celular o si se trata de un fenómeno general.

Efectos *in vivo* de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) en los ratones C57BL6:

La señalización de Notch regula la homeostasia de varios órganos durante el desarrollo. Por ejemplo, la activación de la vía mediada por Notch1 es esencial para el desarrollo de los linfocitos T en el timo (Radtko et al., 1999). Sin embargo, el desarrollo de los linfocitos T impulsado por Notch1 no aparece como dependiente de MAML1, ya que la pérdida de MAML1 no alteraba el desarrollo de los linfocitos T en los ratones. Esto se podría deber a un mecanismo por el que los miembros de la familia de MAML2 y MAML3 compensan la pérdida de MAML1. En el bazo, se necesita la señalización impulsada por Notch2 exclusivamente a través de MAML1 para el desarrollo de los LBZM. La pérdida genética de Notch2 y MAML1 provoca un bloqueo del desarrollo de los LBZM (Wu et al., 2007, Saito et al., 2003). Además, la señalización de Notch a través de Notch1 y Notch2 es esencial para el mantenimiento del compartimento de la cripta. Una retirada genética combinada de Notch1 y Notch2 en el intestino conduce a la metaplasia de células calciformes. Por lo tanto, los solicitantes estudiaron si la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) pudo alterar los procesos de desarrollo dependientes de Notch mencionados más arriba.

En los ensayos de cultivo *in vitro*, el compuesto químico 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) fue capaz de bloquear la activación de la vía mediada por Notch1 y Notch2. Así pues, los solicitantes propusieron que el tratamiento de los ratones con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) podría conducir a una metaplasia de células calciformes del intestino. Para comprobar esta hipótesis, a los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) 25 mg/kg de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) durante 7 días consecutivos. El día 8, se sacrificaron los animales y los tejidos intestinales se fijaron e incluyeron en parafina. El análisis histológico se llevó a cabo con azul alcian para teñir las células calciformes. Sorprendentemente, a pesar de su capacidad para bloquear la activación de la vía mediada por Notch1, así como por Notch2, en los cultivos *in vitro*, el tejido intestinal de los ratones tratados con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) era completamente normal con la estructura intacta y sin ninguna indicación de metaplasia de células calciformes (no se muestran los datos). De igual forma, también se siguió el efecto de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) sobre los cambios de la masa corporal. A los ratones se les inyectaron durante 5 días consecutivos 25 mg/kg de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) y se anotó el cambio de la masa corporal. El tratamiento de los ratones con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no provocó ningún adelgazamiento.

El tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) induce un bloqueo del desarrollo de LBZM:

Los solicitantes propusieron que la inhibición de la señalización de Notch2 mediada por la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) debe conducir a un bloqueo del desarrollo de LBZM del bazo. Se valoró el desarrollo de los LBZM mediante la tinción de los esplenocitos para citometría de flujo con anticuerpos dirigidos contra B220, CD21 y CD23. Tal y como se muestra en la figura 7B, el tratamiento de los ratones con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-

3-amina (I3) conduce a una reducción del porcentaje de la población de LBZM del bazo. Además, la pérdida de población de LBZM del bazo también se refleja en el número absoluto de LBZM (figura 7C).

Por lo tanto, el bloqueo del desarrollo de los LBZM mediado por la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) imita el fenotipo de la pérdida de Notch2 y de MAML1. Sin embargo, todavía queda por ver si la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) ejerce su efecto inhibitor de Notch sólo a través de MAML1 o si podía bloquear la señalización de Notch también a través de otros miembros de la familia de MAML.

El tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) enlentece el crecimiento tumoral de la leucemia de linfocitos T humanos en un modelo de xenotrasplante:

La activación de la señalización de Notch debido a mutaciones activadoras en diferentes componentes de la vía se sabe que provoca más del 50% de las leucemias linfoblásticas agudas de linfocitos T humanos. Así pues, los solicitantes decidieron estudiar la actividad contra el cáncer que tiene el compuesto químico 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) en la leucemia de linfocitos T humanos impulsados por Notch *in vivo*. Para conseguir este objetivo, se consolidaron modelos de xenotrasplante de leucemia de humanos con ratones DNO/IDCG  $\gamma c^{-/-}$ . Se utilizaron las líneas celulares de LLA-T HPB-ALL y RPMI 8402 para este propósito. La línea celular HPB-ALL alberga una mutación L1575P en el dominio de heterodimerización y una inserción en el dominio PEST del receptor Notch1, con lo que se activa constitutivamente la señalización de Notch1. De igual forma, las células RPMI 8402 muestran una activación de la señalización de Notch independiente del ligando debido a una inserción en el resto aminoacídico 1584 en el dominio de heterodimerización y también una mutación de inactivación (R465H) en la E3 ligasa FBW7. Se encontró que ambas líneas celulares responden al tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) en los ensayos de cultivo *in vitro* en términos de proliferación y/o disminución de los genes diana de Notch. Para determinar si estas líneas celulares establecen la leucemia en un contexto de xenotrasplante, se inyectaron un millón de células de cada línea celular por vía intravenosa (i.v.) a ratones DNO/IDCG  $\gamma c^{-/-}$ . Los animales desarrollaron leucemia con una penetrancia del 100% y murieron en el plazo de 4 semanas después del trasplante.

Una vez que se demostró que las líneas celulares RPMI 8402 y HPB-ALL desarrollan la leucemia en un ensayo de xenotrasplante, se transdujeron con un lentivirus que expresaba constitutivamente el gen de la luciferasa. Esto permitió a los solicitantes visualizar y seguir la progresión de la leucemia en los ratones mediante el sistema de detección de toma de imágenes en vivo Caliper IVIS (Xenogen). Para determinar la eficacia contra el cáncer que tiene la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) en los tumores consolidados, se realizó un experimento de mantenimiento. Se inyectaron (i.v.) un millón de células HPB-ALL en los ratones DNO/IDCG  $\gamma c^{-/-}$ . Se siguió el desarrollo de la leucemia en los ratones mediante la detección de las células leucémicas que expresan la luciferasa. Una vez que la enfermedad se consolidó en torno al día 15, los ratones se dividieron en dos grupos. Un grupo se trató con aceite como control y el segundo grupo se trató con 25 mg/kg de 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) cada día. Tal y como se muestra en la figura 8A, los ratones tratados con aceite desarrollan leucemia con una penetrancia del 100%, mientras que la leucemia en los ratones tratados con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no progresaba a la misma velocidad que en el grupo tratado con el aceite (figura 8A).

De igual forma en un experimento preliminar, los ratones DNO/IDCG  $\gamma c^{-/-}$  recibieron un trasplante de  $5 \times 10^5$  células RPMI 8402 y se trataron con aceite o con 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) después de la consolidación de la enfermedad. Tal y como se muestra en la figura 8B, los animales tratados con aceite desarrollaron leucemia, mientras que los ratones tratados con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) estaban libres de la enfermedad. Además, el análisis histológico reveló que, en los ratones tratados con aceite, las células leucémicas progresaban para infiltrarse en el hígado, pero los ratones tratados con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) no desarrollaban ninguna lesión metastásica en el hígado (no se muestran los datos). Ya que estos animales se trataron con el compuesto químico 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) durante 27 días, el tejido intestinal se analizó para detectar alguna toxicidad en el intestino. La tinción con azul alcian del tejido intestinal no reveló ninguna anomalía en el número de células calciformes ni en la estructura intestinal (no se muestran los datos).

Tomados en conjunto, los datos de los solicitantes del modelo de xenotrasplante para la leucemia humana sugieren que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) tiene la capacidad de enlentece la progresión de la enfermedad de una leucemia ya consolidada. Debido a su capacidad para repercutir sobre la progresión de los tumores, la I3 podría ser una candidata idónea para desarrollarla más a modo de anticancerígeno.

Los tumores de mama de ratona MMTV-ErbB2 muestran la activación de la señalización de Notch y el efecto de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) sobre la progresión de los tumores de mama.

En el cáncer de mama de humanos, los niveles elevados de las proteínas Notch1 y Jagged 1 se correlacionaban con una peor supervivencia de las pacientes con cáncer de mama. Además, la activación de la señalización de Notch en el cáncer de mama de humanos también facilita la metástasis ósea y de pulmón. Por lo tanto, para determinar el potencial anticanceroso del compuesto químico 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) en el cáncer de mama, se estudió un modelo de ratón para cáncer de mama. La sobreexpresión de ErbB2 impulsada por el virus del tumor de mama de ratón (MMTV) se sabe que provoca tumores de mama en las ratonas. Las ratonas transgénicas MMTV-ErbB2 desarrollan tumores de mama con una latencia de aproximadamente 5-6 meses junto con el desarrollo de

metástasis de pulmón. Una de las características de los tumores de mama de ratonas MMTV-ErbB2 es la presencia de tipos de células epiteliales predominantemente luminales. Se sabe que la señalización de Notch conduce la diferenciación celular luminal a partir de las células madre de la mama de ratona. Por lo tanto, los solicitantes propusieron que la activación de la vía de Notch en los tumores de mama MMTV-ErbB2 podría contribuir a la oncogénesis en parte al favorecer la diferenciación de células epiteliales luminales. Con este fin, los solicitantes estudiaron los niveles de la activación de la señalización de Notch en los tumores de mama MMTV-ErbB2-IRES-Cre mediante la medición de la cantidad de Hes1 por análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Tal y como se muestra en la figura 9A, los tumores de mama impulsados por MMTV-ErbB2 expresan una gran cantidad de la proteína Hes1 en comparación con las glándulas mamarias normales emparejadas según la edad. Para investigar el efecto de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) sobre el desarrollo del cáncer de mama, se recogieron tumores de mama MMTV-ErbB2 de ratonas FVB que llevaban el transgén MMTV-ErbB2. Se preparó una suspensión de células sueltas y se inyectaron  $5 \times 10^5$  células tumorales en una almohadilla de grasa vacía de una ratona FVB destinataria. Una vez que se habían desarrollado tumores palpables, las ratonas destinatarias se trataron con aceite o bien con 25 mg/kg de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) en días alternos hasta el final del experimento. El volumen tumoral se midió y se anotó a intervalos regulares. Los resultados preliminares demostraron que el tratamiento de las ratonas destinatarias portadoras de tumores con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) provocó un retraso significativo del crecimiento tumoral en comparación con las ratonas tratadas con el aceite solo (figura 9B). Estos datos demostraron que la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) tiene la capacidad de entretener el crecimiento del cáncer de mama consolidado.

La 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) bloquea la señalización de Notch en las leucemias linfoblásticas agudas primarias de linfocitos T humanos:

Para estudiar adicionalmente el efecto inhibidor de Notch que tiene la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) en una afección patológica pertinente, las muestras de LLA-T primaria se perfilaron por la activación de la señalización de Notch. Se utilizó una acumulación de la forma activa de Notch (NICD) como biomarcador de la activación de la vía. Varias LLA-T humanas primarias mostraban una acumulación de NICD oncogénico y el tratamiento de estos tumores con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) condujo a una disminución de esta proteína. Además, la disminución de NICD en estas muestras de LLA-T primaria de humano se correlacionaba con una parada de la proliferación (no se muestran los datos). Por el contrario, las muestras de LLA-T primaria de humano que no muestran una cantidad detectable de NICD no respondían al tratamiento con la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) (no se muestran los datos).

Estos datos indican que se puede utilizar una acumulación de NICD como biomarcador para la activación de la vía de Notch y predecir el resultado del tratamiento mediante el inhibidor de Notch 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3).

Diferentes derivados de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) muestran la capacidad de bloquear la activación de la señalización de Notch en un ensayo de cocultivo de DL4-N1:

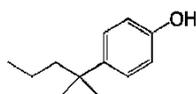
Para reforzar la actividad inhibidora de Notch, así como la eficacia del compuesto 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) parental, se analizaron diferentes derivados químicos de I3 en un ensayo de cocultivo de DL4-N1. El cribado de más de 40 derivados químicos diferentes de la 6-(4-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) produjo los siguientes compuestos por su capacidad para bloquear la activación de la vía de Notch en un ensayo de cocultivo (figura 10). I3-A) 6-(4-ciclohexilfenoxi)piridin-3-amina, I3-B) 6-(4-*terc*-pentilfenoxi)piridin-3-amina (n.º de CAS 1036533-91-1), I3-C) 4-(4-*terc*-butilfenoxi)anilina (n.º de CAS 56705-89-6), I3-D) 6-(4-butilfenoxi)piridin-3-amina, I3-E) 4-(4-*terc*-pentilfenoxi)anilina (n.º de CAS 328032-81-1), I3-F) 4-(4-ciclohexilfenoxi)anilina (n.º de CAS 70682-64-3), I3-G) 6-(4-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-il)fenoxi)piridin-3-amina, I3-H) 6-(3-*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (n.º de CAS 1098366-43-8), I3-I) 4-(4-*terc*-butilfenoxi)-3-fluoroanilina (n.º de CAS 946785-77-9), I3-J) 4-(4-isopropilfenoxi)anilina, I3-K) 6-(4-(2,4,4-trimetilpentan-2-il)fenoxi)piridin-3-amina, I3-L) 4-(4-ciclohexilfenoxi)-3-fluoroanilina, I3-M) 3-fluoro-4-(4-*terc*-pentilfenoxi)anilina, I3-N) 6-(4-(2-metilpentan-2-il)fenoxi)piridin-3-amina, I3-O) 4-(4-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-il)fenoxi)anilina, I3-P) 4-(4-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-il)fenoxi)-3-fluoroanilina.

Tal y como se muestra en la figura 10, algunos de estos derivados (I3-A, I3-B, I3-C, I3-E, I3-G, I3-H, I3-M e I3-N) bloquean la señalización de Notch a niveles comparables al compuesto I3 parental, mientras que los derivados I3-F e I3-I aparecen con una actividad reforzada.

### Ejemplo 3

Síntesis química del derivado y de los precursores del mismo

#### 4-(2-Metilpentan-2-il)fenol



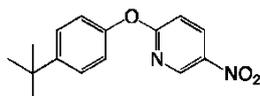
Se suspendió 4-butirilfenol (1000 mg, 6,09 mmol, 1,00 eq) en tolueno (25 ml) y DCM (5 ml), y se enfrió a 0 °C. Una

solución de  $\text{Me}_3\text{Al}$  a 2 M en tolueno (7 ml, 14,01 mmol, 2,30 eq) se añadió gota a gota para que se disolviera la sustancia de partida. Después de agitar a temperatura ambiente durante 15 h, la mezcla de reacción se enfrió de nuevo a 0 °C y se le añadió gota a gota  $\text{TMSOSO}_2\text{CF}_3$  (1,1 ml, 6,09 mmol, 1,00 eq). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 días, se paró la reacción vertiendo la mezcla en agua helada. Después de la acidificación con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 40%, se extrajo el producto con acetato de etilo (3×) y se lavaron las capas orgánicas con la solución de  $\text{NaCl}$  acuosa saturada ácida- $\text{H}_3\text{PO}_4$ . El solvente se retiró a presión reducida a 30 °C. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía rápida en columna ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{DCM}$ /éter de petróleo de 1:1 a 2:1) para dar el compuesto del título como un aceite incoloro (188 mg, con una pureza de alrededor del 90% (por RMN), 0,95 mmol, rendimiento del 15 %).  $R_f = 0,60$  ( $\text{DCM}/\text{MeOH}$  4%). HRMS (ESI) calculado para  $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  177,1279, encontrado: 177,1284.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,24 - 7,18 (m, 2H, *H* aromático), 6,82 - 6,76 (m, 2H, *H* aromático), 5,12 (s, 1H, *OH*), 1,60 - 1,52 (m, 2H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,27 (s, 6H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,16 - 1,01 (m, 2H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0,83 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153,03, 142,29, 127,11, 114,85, 47,35, 37,25, 29,23, 18,09, 14,90.

#### Procedimiento A general:

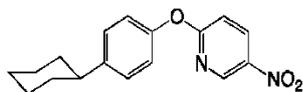
Las nitropiridinas o los nitrobenzenos correspondientes y los fenoles concretos se disolvieron en DMF o DMSO. Se les añadió  $\text{K}_2\text{CO}_3$  anhidro y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, a menos que se indique otra cosa, hasta la conversión completa. A continuación, la reacción se paró con la adición de  $\text{H}_2\text{O}$  y el producto se extrajo con  $\text{EtOAc}$  o  $\text{Et}_2\text{O}$ . Se lavaron las capas orgánicas con la solución acuosa de  $\text{NaOH}$  a 1 M (1×) y después con la solución acuosa saturada de  $\text{NaCl}$  (1×). El solvente se retiró hasta la secarlo completamente a presión reducida a 30 °C. El residuo se resolvió en  $\text{DCM}$  y se filtró por un algodón para retirar las sales inorgánicas. El producto bruto se purificó mediante una cromatografía rápida en columna para proporcionar los correspondientes compuestos del título (I3-n, I3-nA a I3-nP).

#### 2-(4-(terc-Butil)fenoxi)-5-nitropiridina, I3-n



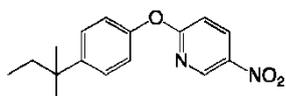
Si siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMF (6,0 ml) 2-cloro-5-nitropiridina (501 mg, 3,16 mmol, 1,00 eq) y 4-terc-butilfenol (611 mg, 4,07 mmol, 1,29 eq). Se le añadió  $\text{K}_2\text{CO}_3$  anhidro (654 mg, 4,73 mmol, 1,50 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 h. Después de la extracción con  $\text{Et}_2\text{O}$ , el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{EtOAc}$ /éter de petróleo de 1:100 a 1:50) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (820 mg, 3,01 mmol, rendimiento del 95%).  $R_f = 0,40$  ( $\text{EtOAc}/\text{PE}$  1:20). HRMS (ESI) calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  273,1234, encontrado: 273,1229.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,06 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1H, *H* aromático), 8,46 (dd,  $J = 9,1, 2,8$  Hz, 1H, *H* aromático), 7,53 - 7,42 (m, 2H, *H* aromático), 7,17 - 7,05 (m, 2H, *H* aromático), 7,01 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H, *H* aromático), 1,35 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167,20, 150,49, 148,98, 145,26, 140,29, 134,95, 126,99, 120,84 111,38, 34,72, 31,57.

#### 2-(4-Ciclohexilfenoxi)-5-nitropiridina, I3-nA



Si siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMSO (6 ml) 2-cloro-5-nitropiridina (300 mg, 1,89 mmol, 1,00 eq) y 4-ciclohexilfenol (417 mg, 2,37 mmol, 1,25 eq). Se le añadió  $\text{K}_2\text{CO}_3$  anhidro (397 mg, 2,87 mmol, 1,52 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 27 h. Después de la extracción con  $\text{Et}_2\text{O}$ , el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{EtOAc}$ /éter de petróleo de 1:100 a 1:75) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (600 mg, 2,01 mmol, rendimiento cuant.).  $R_f = 0,35$  ( $\text{EtOAc}/\text{PE}$  1:20). HRMS (ESI) calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  299,1390, encontrado: 299,1392.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,06 (d,  $J = 2,9$  Hz, 1H, *H* aromático), 8,46 (dd,  $J = 9,1, 2,9$  Hz, 1H, *H* aromático), 7,31 - 7,22 (m, 2H, *H* aromático), 7,07 (dd,  $J = 8,7, 2,3$  Hz, 2H, *H* aromático), 7,00 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H, *H* aromático), 2,58 - 2,51 (m, 1H, *H* ciclohexilo), 2,01 - 1,64 (m, 5H, *H* ciclohexilo), 1,56 - 1,10 (m, 5H, *H* ciclohexilo).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167,18, 150,71, 145,88, 145,17, 140,22, 134,89, 128,30, 121,12, 111,30, 44,08, 34,59, 26,95, 26,19.

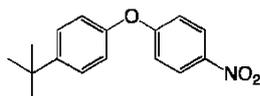
#### 5-Nitro-2-(4-terc-pentil)fenoxi)piridina, I3-nB



Si siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMSO (6 ml) 2-cloro-5-nitropiridina (303 mg, 1,91 mmol, 1,00 eq) y 4-terc-pentilfenol (397 mg, 2,42 mmol, 1,27 eq). Se le añadió  $\text{K}_2\text{CO}_3$  anhidro (403 mg, 2,92 mmol, 1,53 eq) y la

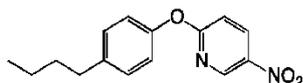
mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 h. Después de la extracción con Et<sub>2</sub>O, el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; EtOAc/éter de petróleo 1:100) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (530 mg, 1,85 mmol, rendimiento del 97%). R<sub>f</sub> = 0,31 (EtOAc/PE 1:20). HRMS (ESI) calculado para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 287,1390, encontrado: 287,1381. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,07 - 9,05 (m, 1H, *H* aromático), 8,45 (dd, *J* = 9,4, 2,4 Hz, 1H, *H* aromático), 7,40 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, *H* aromático), 7,09 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, *H* aromático), 6,99 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, *H* aromático), 1,67 (q, *J* = 7,4 Hz, 2H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,31 (s, 6H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,73 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167,17, 150,46, 147,34, 145,20, 140,27, 134,90, 127,56, 120,72, 111,28, 37,89, 37,06, 28,55, 9,26.

1-(*terc*-Butil)-4-(4-nitrofenoxi)benceno, I3-nC



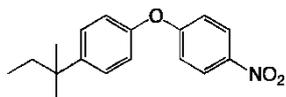
10 Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMF (6,0 ml) 4-fluoronitrobenzoceno (500 mg, 3,54 mmol, 1,00 eq) y 4-*terc*-butilfenol (671 mg, 4,46 mmol, 1,26 eq). Se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (857 mg, 6,20 mmol, 1,75 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 52 h. Después de la extracción con EtOAc, el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; EtOAc/éter de petróleo 1:100) para dar el compuesto del título como un sólido amarillento pálido (860 mg, 3,17 mmol, rendimiento del 89%). R<sub>f</sub> = 0,72 (EtOAc/PE 1:9). HRMS (ESI) calculado para C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 272,1281, encontrado: 272,1272. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,24 - 8,16 (m, 2H, *H* aromático), 7,49 - 7,39 (m, 2H, *H* aromático), 7,06 - 6,97 (m, 4H, *H* aromático), 1,35 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,82, 152,29, 148,59, 142,54, 127,27, 126,03, 120,15, 116,98, 34,67, 31,58.

20 2-(4-Butilfenoxi)-5-nitropiridina, I3-nD



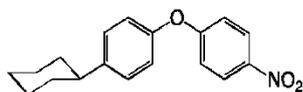
25 Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMF (2,5 ml) 2-cloro-5-nitropiridina (103 mg, 0,65 mmol, 1,00 eq) y 4-butilfenol (126 mg, 0,84 mmol, 1,29 eq). Se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (143 mg, 1,04 mmol, 1,59 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. Después de la extracción con Et<sub>2</sub>O, el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; EtOAc/éter de petróleo 1:100) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (190 mg, 0,70 mmol, rendimiento cuant.). R<sub>f</sub> = 0,33 (EtOAc/PE 1:20). HRMS (ESI) calculado para C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 273,1234, encontrado: 273,1226. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,05 (dd, *J* = 2,9, 0,6 Hz, 1H, *H* aromático), 8,46 (dd, *J* = 9,1, 2,8 Hz, 1H, *H* aromático), 7,32 - 7,21 (m, 2H, *H* aromático), 7,11 - 7,02 (m, 2H, *H* aromático), 7,00 (dd, *J* = 9,0, 0,6 Hz, 1H, *H* aromático), 2,69 - 2,60 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,70 - 1,57 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,39 (dq, *J* = 14,6, 7,3 Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,95 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, Ar-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167,27, 150,75, 145,22, 140,86, 140,30, 134,92, 129,91, 121,22, 111,32, 35,21, 33,67, 22,51, 14,08.

35 1-Nitro-4-(4-*terc*-pentil)fenoxi)benceno, I3-nE



40 Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMSO (6 ml) 4-fluoronitrobenzoceno (318 mg, 2,25 mmol, 1,00 eq) y 4-*terc*-pentilfenol (460 mg, 2,28 mmol, 1,24 eq). Se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (465 mg, 3,37 mmol, 1,49 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de la extracción con Et<sub>2</sub>O, el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; EtOAc/éter de petróleo 1:100) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (533 mg, 1,87 mmol, rendimiento del 83%). R<sub>f</sub> = 0,70 (EtOAc/PE 1:20). HRMS (ESI) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 285,1365, encontrado: 285,1359. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,25 - 8,14 (m, 2H, *H* aromático), 7,44 - 7,32 (m, 2H, *H* aromático), 7,06 - 6,96 (m, 4H, *H* aromático), 1,66 (q, *J* = 7,4 Hz, 2H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,31 (s, 6H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,71 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,81, 152,24, 146,94, 142,56, 127,91, 126,01, 120,06, 116,99, 37,89, 37,06, 28,63, 9,27.

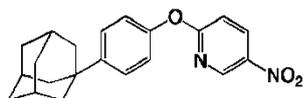
45 1-Ciclohexil-4-(4-nitrofenoxi)benceno, I3-nF



Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMSO (6,0 ml) 4-fluoronitrobenzoceno (325 mg, 2,30 mmol, 1,00 eq) y 4-ciclohexilfenol (519 mg, 2,94 mmol, 1,28 eq). Se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (513 mg, 3,72 mmol, 1,61 eq) y la

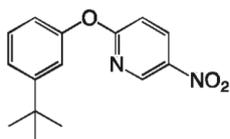
mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. Después de la extracción con Et<sub>2</sub>O, el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; EtOAc/éter de petróleo de 1:100 a 1:50) para dar el compuesto del título como un sólido amarillento pálido (640 mg, 2,15 mmol, rendimiento del 93%). *R<sub>f</sub>* = 0,55 (EtOAc/PE 1:20). HRMS (ESI) calculado para C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 298,1438, encontrado: 298,1442. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,31 - 8,11 (m, 2H, *H* aromático), 7,26 (d, *J* = 2,3 Hz, 2H, *H* aromático), 7,13 - 6,92 (m, 4H, *H* aromático), 2,57 - 2,50 (m, 1H, *H* ciclohexilo), 2,09 - 1,67 (m, 5H, *H* ciclohexilo), 1,59 - 1,18 (m, 5H, *H* ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,89, 152,61, 145,58, 142,57, 128,66, 126,04, 120,49, 116,99, 44,14, 34,72, 26,99, 26,23.

2-(4-((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1-yl)fenoxi)-5-nitropiridina, 13-nG).



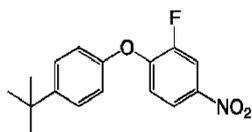
Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMSO (6 ml) 2-cloro-5-nitropiridina (300 mg, 1,89 mmol, 1,00 eq) y 4-adamantilfenol (546 mg, 2,39 mmol, 1,26 eq). Se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (662 mg, 4,79 mmol, 2,53 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 42 h. Después de la extracción con Et<sub>2</sub>O, el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; EtOAc/éter de petróleo de 1:100 a 1:50) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (664 mg, 1,89 mmol, rendimiento cuant.). *R<sub>f</sub>* = 0,36 (EtOAc/PE 1:20). HRMS (ESI) calculado para C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 351,1703, encontrado: 351,1701. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,06 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, *H* aromático), 8,45 (dd, *J* = 9,1, 2,8 Hz, 1H, *H* aromático), 7,52 - 7,39 (m, 2H, *H* aromático), 7,16 - 7,06 (m, 2H, *H* aromático), 7,00 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H, *H* aromático), 2,13 - 2,10 (m, 3H, *H* adamantilo), 1,94 (d, *J* = 3,0 Hz, 5H, *H* adamantilo), 1,87 - 1,70 (m, 5H, *H* adamantilo). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167,19, 150,51, 149,18, 145,20, 140,26, 134,89, 126,53, 120,83, 111,32, 43,35, 36,82, 36,18, 29,02.

2-(3-(terc-Butil)fenoxi)-5-nitropiridina, 13-nH



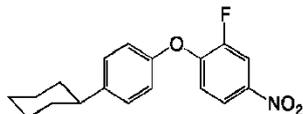
Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMSO (6 ml) 2-cloro-5-nitropiridina (300 mg, 1,89 mmol, 1,00 eq) y 3-terc-butilfenol (358 mg, 2,38 mmol, 1,26 eq). Se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (420 mg, 3,04 mmol, 1,60 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 70 h. Después de la extracción con Et<sub>2</sub>O, el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; EtOAc/éter de petróleo 1:100) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (512 mg, 1,88 mmol, rendimiento del 99%). *R<sub>f</sub>* = 0,37 (EtOAc/PE 1:20). HRMS (ESI) calculado para C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 273,1234, encontrado: 273,1232. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,08 - 9,04 (m, 2H, *H* aromático), 8,47 (dd, *J* = 9,1, 2,8 Hz, 1H, *H* aromático), 7,39 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, *H* aromático), 7,33 (ddd, *J* = 7,9, 1,8, 1,2 Hz, 1H, *H* aromático), 7,17 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H, *H* aromático), 7,01 (dd, *J* = 9,1, 0,5 Hz, 1H, *H* aromático), 6,98 (ddd, *J* = 7,9, 2,4, 1,2 Hz, 1H, *H* aromático), 1,34 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167,21, 153,88, 152,76, 145,26, 140,31, 134,93, 129,50, 123,17, 118,62, 118,47, 111,28, 35,02, 31,36.

1-(4-(terc-Butil)fenoxi)-2-fluoro-4-nitrobenceno, 13-nI



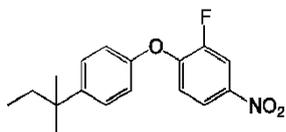
Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMSO (6 ml) 3,4-difluoronitrobenceno (401 mg, 2,52 mmol, 1,00 eq) y 4-terc-butilfenol (477 mg, 3,18 mmol, 1,26 eq). Se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (522 mg, 3,78 mmol, 1,50 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 19 h. Después de la extracción con Et<sub>2</sub>O, el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; EtOAc/éter de petróleo 1:50) para dar el compuesto del título como un aceite incoloro (722 mg, 2,52 mmol, rendimiento del 99%). *R<sub>f</sub>* = 0,54 (EtOAc/PE 1:20). HRMS (ESI) calculado para C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>FNO<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 290,1187, encontrado: 290,1194. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,07 (dd, *J* = 10,3, 2,7 Hz, 1H, *H* aromático), 7,96 (ddd, *J* = 9,1, 2,7, 1,5 Hz, 1H, *H* aromático), 7,49 - 7,38 (m, 2H, *H* aromático), 7,09 - 6,99 (m, 2H, *H* aromático), 6,96 (dd, *J* = 9,1, 8,0 Hz, 1H, *H* aromático), 1,35 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153,35, 152,23, 151,93, 151,82, 150,84, 148,70, 142,40, 142,33, 127,29, 120,68, 120,64, 119,38, 117,73, 117,71, 113,28, 113,05, 34,65, 31,54.

## 1-(4-Ciclohexilfenoxi)-2-fluoro-4-nitrobenzono, 13-nJ



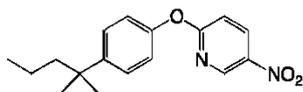
5 Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMSO (6 ml) 3,4-difluoronitrobenzono (509 mg, 3,20 mmol, 1,00 eq) y 4-ciclohexilfenol (691 mg, 3,93 mmol, 1,23 eq). Se le añadió  $K_2CO_3$  anhidro (664 mg, 4,81 mmol, 1,50 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 23 h. Después de la extracción con  $Et_2O$ , el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna ( $SiO_2$ ; EtOAc/éter de petróleo 1:50) para dar el compuesto del título como un sólido amarillento pálido (1002 mg, 3,18 mmol, rendimiento del 99%).  $R_f = 0,51$  (EtOAc/PE 1:20). HRMS (ESI) calculado para  $C_{18}H_{19}FNO_3^+ [M+H]^+$  316,1343, encontrado: 316,1348.  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,09 (dd,  $J = 10,3, 2,7$  Hz, 1H, *H* aromático), 7,97 (ddd,  $J = 9,1, 2,7, 1,4$  Hz, 1H, *H* aromático), 7,33 - 7,22 (m, 2H, *H* aromático), 7,08 - 6,99 (m, 2H, *H* aromático), 6,96 (dd,  $J = 9,1, 8,0$  Hz, 1H, *H* aromático), 2,58 - 2,51 (m, 1H, *H* ciclohexilo), 1,98 - 1,73 (m, 5H, *H* ciclohexilo), 1,52 - 1,20 (m, 5H, *H* ciclohexilo).  $^{13}C$  RMN (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  153,35, 152,51, 152,01, 151,90, 150,84, 145,68, 142,39, 142,32, 128,67, 120,70, 120,66, 119,73, 117,70, 117,68, 113,30, 113,08, 44,09, 34,69, 26,97, 26,21.

## 2-Fluoro-4-nitro-1-(4-terc-pentil)fenoxi)benzono, 13-nK



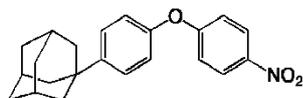
15 Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMSO (6 ml) 3,4-difluoronitrobenzono (502 mg, 3,16 mmol, 1,00 eq) y 4-terc-pentilfenol (4 mg, 693 mg, 4,22 mmol, 1,34 eq). Se le añadió  $K_2CO_3$  anhidro (656 mg, 4,75 mmol, 1,50 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 22 h. Después de la extracción con  $Et_2O$ , el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna ( $SiO_2$ ; EtOAc/éter de petróleo 1:50) para dar el compuesto del título como un aceite amarillento pálido (943 mg, 3,11 mmol, rendimiento del 99%).  $R_f = 0,61$  (EtOAc/PE 1:20). HRMS (ESI) calculado para  $C_{17}H_{19}NO_3^+ [M+H]^+$  304,1343, encontrado: 304,1332.  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,08 (dd,  $J = 10,3, 2,7$  Hz, 1H, *H* aromático), 7,96 (ddd,  $J = 9,1, 2,7, 1,5$  Hz, 1H, *H* aromático), 7,42 - 7,35 (m, 2H, *H* aromático), 7,07 - 6,99 (m, 2H, *H* aromático), 6,95 (dd,  $J = 9,1, 8,0$  Hz, 1H, *H* aromático), 1,66 (q,  $J = 7,4$  Hz, 2H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,31 (s, 6H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,71 (t,  $J = 7,4$  Hz, 3H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).  $^{13}C$  RMN (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  153,40, 152,19, 151,98, 151,87, 150,88, 147,11, 127,97, 120,71, 120,68, 119,34, 117,73, 117,71, 113,11, 37,92, 37,08, 28,64.

## 2-(4-(2-Metilpentan-2-il)fenoxi)-5-nitropiridina, 13-nL



30 Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMSO (6 ml) 4-(2-metilpentan-2-il)fenol (52 mg, 0,29 mmol, 1,00 eq.) y 2-cloro-5-nitropiridina (57 mg, 0,36 mmol, 1,23 eq.). Se le añadió  $K_2CO_3$  anhidro (66 mg, 0,48 mmol, 1,65 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 27 h. Después de la extracción con  $Et_2O$ , el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna ( $SiO_2$ ; EtOAc/éter de petróleo 1:50) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (86 mg, 0,29 mmol, rendimiento del 98%).  $R_f = 0,50$  (EtOAc/PE 1:10). HRMS (ESI) calculado para  $C_{17}H_{21}N_2O_3^+ [M+H]^+$  301,1547, encontrado: 301,1545.  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9,07 (d,  $J = 2,7$  Hz, 1H, *H* aromático), 8,46 (dd,  $J = 9,1, 2,8$  Hz, 1H, *H* aromático), 7,45 - 7,35 (m, 2H, *H* aromático), 7,14 - 7,05 (m, 2H, *H* aromático), 6,99 (dd,  $J = 9,0, 0,6$  Hz, 1H, *H* aromático), 1,65 - 1,54 (m, 2H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,32 (s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,19 - 1,05 (m, 2H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,84 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).  $^{13}C$  RMN (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  167,17, 150,43, 147,69, 145,21, 140,26, 134,90, 127,44, 120,72, 111,29, 47,27, 37,74, 29,07, 18,08, 14,87.

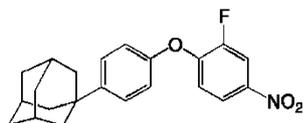
## (3r,5r,7r)-1-(4-(4-Nitrofenoxi)fenil)adamantano, 13-nM



45 Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMSO (6 ml) 4-fluoronitrobenzono (303 mg, 2,15 mmol, 1,00 eq) y 4-adamantilfenol (600 mg, 2,63 mmol, 1,22 eq). Se le añadió  $K_2CO_3$  anhidro (450 mg, 3,26 mmol, 1,52 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Después de la extracción con  $Et_2O$ , el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna ( $SiO_2$ ; EtOAc/éter de petróleo de 1:100 a 1:50) para dar

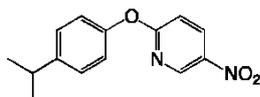
el compuesto del título como un sólido amarillento pálido (736 mg, 2,11 mmol, rendimiento del 98%).  $R_f = 0,73$  (EtOAc/PE 1:10). HRMS (ESI) calculado para  $C_{22}H_{24}NO_3^+$   $[M+H]^+$  350,1751, encontrado: 350,1760.  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,27 8,10 (m, 2H, *H* aromático), 7,46 - 7,35 (m, 2H, *H* aromático), 7,08 - 6,95 (m, 4H, *H* aromático), 2,13 - 2,10 (m, 3H, *H* adamantilo), 1,93 (d,  $J = 2,9$  Hz, 6H, *H* adamantilo), 1,88 - 1,70 (m, 6H, *H* adamantilo).  $^{13}C$  RMN (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  163,85, 152,30, 148,86, 142,53, 126,86, 126,85, 126,03, 120,18, 117,00, 43,40, 36,82, 36,17, 29,03.

(3*r*,5*r*,7*r*)-1-(4-(2-Fluoro-4-nitrofenoxi)fenil)adamantano, I3-nN



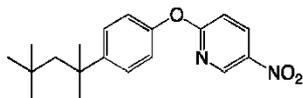
Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMSO (6 ml) 3,4-difluoronitrobenzono (303 mg, 1,90 mmol, 1,00 eq) y 4-adamantilfenol (533 mg, 2,34 mmol, 1,23 eq). Se le añadió  $K_2CO_3$  anhidro (395 mg, 2,86 mmol, 1,50 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Después de la extracción con  $Et_2O$ , el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna ( $SiO_2$ ; EtOAc/éter de petróleo 1:100) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (703 mg, 1,91 mmol, rendimiento cuant.).  $R_f = 0,69$  (EtOAc/PE 1:10). HRMS (APPI) calculado para  $C_{22}H_{22}FNO^+$   $[M]^+$  367,1584, encontrado: 367,1581.  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,08 (dd,  $J = 10,3, 2,7$  Hz, 1H, *H* aromático), 7,96 (ddd,  $J = 9,1, 2,7, 1,5$  Hz, 1H, *H* aromático), 7,46 - 7,36 (m, 2H, *H* aromático), 7,06 - 7,00 (m, 2H, *H* aromático), 6,95 (dd,  $J = 9,1, 8,0$  Hz, 1H, *H* aromático), 2,17 - 2,07 (m, 3H, *H* adamantilo), 1,92 (d,  $J = 2,9$  Hz, 5H, *H* adamantilo), 1,87 - 1,71 (m, 5H, *H* adamantilo).  $^{13}C$  RMN (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  153,36, 153,35, 152,24, 152,21, 151,99, 151,88, 150,85, 150,83, 148,98, 126,89, 120,70, 120,66, 119,44, 119,42, 117,72, 117,70, 113,30, 113,07, 43,38, 36,81, 36,17, 29,02.

2-(4-Isopropilfenoxi)-5-nitropiridina, I3-nO



Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMF (6,0 ml) 2-cloro-5-nitropiridina (303 mg, 1,91 mmol, 1,00 eq) y 4-iso-propilfenol (331 mg, 2,43 mmol, 1,27 eq). Se le añadió  $K_2CO_3$  anhidro (398 mg, 2,88 mmol, 1,51 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Después de la extracción con  $Et_2O$ , el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna ( $SiO_2$ ; EtOAc/éter de petróleo 1:100) para dar el compuesto del título como un sólido amarillento pálido (490 mg, 1,90 mmol, rendimiento del 99%).  $R_f = 0,40$  (EtOAc/PE 1:20). HRMS (ESI) calculado para  $C_{14}H_{15}N_2O_3^+$   $[M+H]^+$  259,1077, encontrado: 259,1072.  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9,04 (d,  $J = 3,4$  Hz, 1H, *H* aromático), 8,44 (dd,  $J = 9,1, 2,8$  Hz, 1H, *H* aromático), 7,37 - 7,28 (m, 2H, *H* aromático), 7,12 - 7,06 (m, 2H, *H* aromático), 7,03 - 6,97 (m, 1H, *H* aromático), 2,96 (hept,  $J = 6,9$  Hz, 1H,  $CH(CH_3)_2$ ), 1,30 (d,  $J = 7,0$  Hz, 6H,  $CH(CH_3)_2$ ).  $^{13}C$  RMN (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  167,08, 150,67, 146,49, 145,02, 140,18, 134,81, 127,84, 121,11, 111,24, 33,62, 24,03.

5-Nitro-2-(4-(2,4,4-trimetilpentan-2-il)fenoxi)piridina, I3-nP



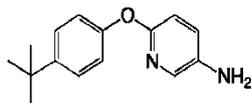
Siguiendo el procedimiento A, se disolvieron en DMSO (5 ml) 2-cloro-5-nitropiridina (303 mg, 1,91 mmol, 1,00 eq) y 4-terc-octilfenol (495 mg, 2,40 mmol, 1,25 eq). Se le añadió  $K_2CO_3$  anhidro (426 mg, 3,08 mmol, 1,61 eq) y la mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 28 h. Después de la extracción con  $Et_2O$ , el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna ( $SiO_2$ ; EtOAc/éter de petróleo 1:50) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (598 mg, 1,82 mmol, rendimiento del 95%).  $R_f = 0,65$  (EtOAc/PE 1:10). HRMS (ESI) calculado para  $C_{19}H_{25}N_2O_3^+$   $[M+H]^+$  329,1860, encontrado: 329,1854.  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9,07 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1H, *H* aromático), 8,45 (dd,  $J = 9,1, 2,8$  Hz, 1H, *H* aromático), 7,52 - 7,40 (m, 2H, *H* aromático), 7,14 - 7,03 (m, 2H, *H* aromático), 6,97 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H, *H* aromático), 1,76 (s, 2H,  $Ar-C(CH_3)_2CH_2C(CH_3)_3$ ), 1,40 (s, 6H,  $Ar-C(CH_3)_2CH_2C(CH_3)_3$ ), 0,75 (s, 9H,  $Ar-C(CH_3)_2CH_2C(CH_3)_3$ ).  $^{13}C$  RMN (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  167,24, 150,49, 148,12, 145,30, 140,29, 134,92, 127,78, 120,57, 111,15, 57,28, 38,63, 32,55, 31,93, 31,62.

Procedimiento B general:

Los correspondientes nitroderivados (I3-n, I3-nA a I3-nP) se disolvieron primero en MeOH o tolueno, o se añadieron directamente a una suspensión de cantidades catalíticas de Pd (10%) sobre un polvo de carbón activado en MeOH. Se purgó el matraz con  $H_2$  (6x) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta la conversión completa. A continuación, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite. El disolvente se retiró a presión reducida

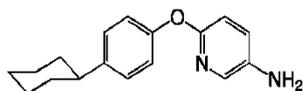
a 30 °C y el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna para dar los correspondientes compuestos del título (I3, I3-A a I3-P).

6-(4-(terc-Butil)fenoxi)piridin-3-amina, I3



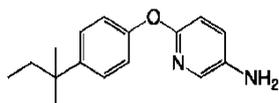
- 5 Siguiendo el procedimiento B, I3-n (300 mg, 1,10 mmol, 1,00 eq) se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (82 mg, 0,08 mmol de Pd, 0,07 eq) en MeOH (15 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (6×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM/MeOH 1%) para dar el compuesto del título como un sólido beis pálido (250 mg, 1,03 mmol, rendimiento del 94%). R<sub>f</sub> = 0,40 (DCM/MeOH 4%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 243,1492, encontrado: 243,1487. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,69 (d, J = 3,0 Hz, 1H, H aromático), 7,39 - 7,31 (m, 2H, H aromático), 7,03 (dd, J = 8,6, 3,0 Hz, 1H, H aromático), 7,00 - 6,93 (m, 2H, H aromático), 6,72 (d, J = 8,6 Hz, 1H, H aromático), 3,48 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 1,31 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,62, 153,28, 146,33, 138,82, 134,06, 126,86, 126,47, 119,24, 112,36, 34,33, 31,52.

6-(4-(Ciclohexilfenoxi)piridin-3-amina, I3-A



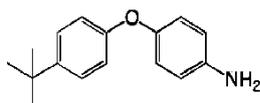
- 15 Siguiendo el procedimiento B, I3-nA (201 mg, 0,67 mmol, 1,00 eq) se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (47 mg, 0,04 mmol de Pd, 0,07 eq) en MeOH (15 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (6×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM/MeOH 1%) para dar el compuesto del título como un sólido beis (190 mg, 0,71 mmol, rendimiento cuant.). R<sub>f</sub> = 0,36 (DCM/MeOH 4%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 269,1648, encontrado: 269,1643. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,70 (d, J = 2,9 Hz, 1H, H aromático), 7,22 - 7,13 (m, 2H, H aromático), 7,04 (dd, J = 8,6, 3,0 Hz, 1H, H aromático), 7,01 - 6,92 (m, 2H, H aromático), 6,73 (dd, J = 8,8, 0,7 Hz, 1H, H aromático), 3,36 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,51 - 2,44 (m, 1H, H ciclohexilo), 1,97 - 1,67 (m, 5H, H ciclohexilo), 1,49 - 1,15 (m, 5H, H ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,88, 153,61, 143,47, 138,67, 134,21, 127,92, 126,96, 119,68, 112,38, 43,99, 34,68, 27,01, 26,25.

6-(4-(terc-Pentil)fenoxi)piridin-3-amina, I3-B



- 30 Siguiendo el procedimiento B, I3-nB (200 mg, 0,70 mmol, 1,00 eq) se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (52 mg, 0,05 mmol de Pd, 0,07 eq) en MeOH (15 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (6×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM/MeOH 0,5%) para dar el compuesto del título como un sólido beis (107 mg, 0,42 mmol, rendimiento del 60%). R<sub>f</sub> = 0,41 (DCM/MeOH 4%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 257,1648, encontrado: 257,1648. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,73 (d, J = 2,9 Hz, 1H, H aromático), 7,34 - 7,23 (m, 2H, H aromático), 7,06 (dd, J = 8,6, 3,0 Hz, 1H, H aromático), 7,02 - 6,94 (m, 2H, H aromático), 6,73 (d, J = 8,6 Hz, 1H, H aromático), 3,35 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 1,62 (q, J = 7,4 Hz, 2H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,27 (s, 6H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,70 (t, J = 7,4 Hz, 3H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,80, 153,36, 144,75, 138,72, 134,30, 127,19, 126,97, 119,13, 112,51, 37,63, 37,04, 28,64, 9,26.

4-(4-(terc-Butil)fenoxi)anilina, I3-C

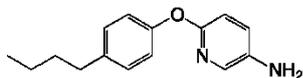


- 40 Siguiendo el procedimiento B, I3-nC (300 mg, 1,11 mmol, 1,00 eq) se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (59 mg, 0,06 mmol de Pd, 0,05 eq) en MeOH (15 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (6×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; acetato de etilo/éter de petróleo de 1:100 a 1:10) para dar el compuesto del título como un aceite amarillo oscuro (244 mg, 1,01 mmol, rendimiento del 91%). R<sub>f</sub> = 0,78 (DCM/MeOH 4%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>NO<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 242,1539, encontrado: 242,1530. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,33 - 7,27

(m, 2H, *H* aromático), 6,91 - 6,84 (m, 4H, *H* aromático), 6,72 - 6,66 (m, 2H, *H* aromático), 3,49 (s, 2H, *NH*<sub>2</sub>), 1,31 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,55, 149,24, 145,05, 142,30, 126,45, 121,08, 116,90, 116,49, 34,33, 31,66.

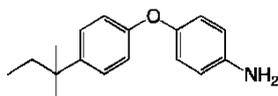
6-(4-(Butilfenoxi)piridin-3-amina, I3-D

5



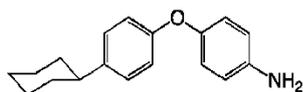
Seguendo el procedimiento B, I3-nD (170 mg, 0,62 mmol, 1,00 eq) se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (53 mg, 0,05 mmol de Pd, 0,08 eq) en MeOH (15 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (6×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM/MeOH 1%) para dar el compuesto del título como un aceite pardo (133 mg, 0,55 mmol, rendimiento del 88%). R<sub>f</sub> = 0,38 (DCM/MeOH 4%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 243,1492, encontrado: 243,1485. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,69 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, *H* aromático), 7,20 - 7,09 (m, 2H, *H* aromático), 7,03 (dd, *J* = 8,6, 3,0 Hz, 1H, *H* aromático), 7,00 - 6,91 (m, 2H, *H* aromático), 6,72 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, *H* aromático), 3,36 (s, 2H, *NH*<sub>2</sub>), 2,67 - 2,51 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,66 - 1,52 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,41 - 1,31 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,93 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, Ar-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,83, 153,55, 138,75, 138,26, 134,12, 129,48, 126,90, 119,74, 112,28, 35,02, 33,74, 22,40, 14,02.

4-(4-(terc-Pentil)fenoxi)anilina, I3-E



Seguendo el procedimiento B, I3-nE (313 mg, 1,10 mmol, 1,00 10 eq) se disolvió en MeOH (10 ml) y se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (52 mg, 0,05 mmol de Pd, 0,04 eq) en MeOH (5 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (6×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El producto bruto se purificó mediante filtración a través de una capa fina de SiO<sub>2</sub> (DCM/MeOH 4%) para dar el compuesto del título como un aceite beis (293 mg, 1,15 mmol, rendimiento cuant.). R<sub>f</sub> = 0,09 (EtOAc/PE 1:20). HRMS (ESI) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 256,1696, encontrado: 256,1692. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,29 - 7,19 (m, 2H, *H* aromático), 6,98 - 6,81 (m, 4H, *H* aromático), 6,76 - 6,61 (m, 2H, *H* aromático), 3,47 (s, 2H, *NH*<sub>2</sub>), 1,63 (q, *J* = 7,4 Hz, 2H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,28 (s, 6H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,71 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,45, 149,08, 143,29, 142,55, 127,08, 121,04, 116,79, 116,33, 37,50, 37,06, 28,69, 9,27.

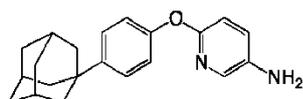
4-(4-Ciclohexilfenoxi)anilina, I3-F



Seguendo el procedimiento B, I3-nF (352 mg, 1,18 mmol, 1,00 eq) se disolvió en tolueno (5 ml) y se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (38 mg, 0,04 mmol de Pd, 0,03 eq) en MeOH (10 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (6×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM) para dar el compuesto del título como un sólido beis (315 mg, 1,18 mmol, rendimiento cuant.). R<sub>f</sub> = 0,86 (DCM/MeOH 4%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>NO<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 268,1696, encontrado: 268,1692. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,17 - 7,07 (m, 2H, *H* aromático), 6,94 - 6,82 (m, 4H, *H* aromático), 6,72 - 6,62 (m, 2H, *H* aromático), 3,49 (s, 2H, *NH*<sub>2</sub>), 2,51 - 2,44 (m, 1H, *H* ciclohexilo), 1,98 - 1,68 (m, 5H, *H* ciclohexilo), 1,46 - 1,21 (m, 5H, *H* ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,87, 149,13, 142,53, 142,05, 127,81, 121,02, 117,22, 116,33, 43,90, 34,79, 27,05, 26,27.

6-(4-((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1-il)fenoxi)piridin-3-amina, I3-G

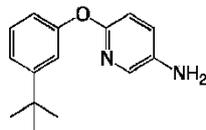
40



Seguendo el procedimiento B, I3-nG (278 mg, 0,79 mmol, 1,00 eq) se disolvió en tolueno (10 ml) y se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (56 mg, 0,05 mmol de Pd, 0,07 eq) en MeOH (10 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (3×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM/MeOH del 0% al 1%) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (176 mg, 0,55 mmol, rendimiento del 69%). R<sub>f</sub> = 0,43 (DCM/MeOH 4%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 321,1961, encontrado: 321,1959. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,71 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H, *H* aromático), 7,37 - 7,29 (m, 2H, *H* aromático), 7,08 - 6,96 (m, 3H, *H* aromático), 6,74 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, *H*

aromático), 3,40 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,12 - 2,09 (m, 3H, *H* adamantilo), 1,93 (dd, *J* = 9,7, 3,0 Hz, 5H, *H* adamantilo), 1,86 - 1,70 (m, 5H, *H* adamantilo). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,73, 153,37, 151,35, 146,65, 138,76, 134,15, 128,14, 126,86, 126,06, 125,54, 124,88, 119,29, 112,40, 43,36, 43,22, 36,87, 36,84, 35,87, 29,02.

6-(3-(terc-Butil)fenoxi)piridin-3-amina, I3-H



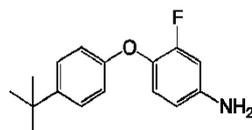
5

Seguendo el procedimiento B, I3-nH (362 mg, 1,33 mmol, 1,00 eq) se disolvió en MeOH (10 ml) y se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (44 mg, 0,04 mmol de Pd, 0,03 eq) en MeOH (5 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (5×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM/MeOH del 0% al 1%) para dar el compuesto del título como un aceite pardusco pálido (303 mg, 1,25 mmol, rendimiento del 94%). *R<sub>f</sub>* = 0,44 (DCM/MeOH 4%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 243,1492, encontrado: 243,1493. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,92 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H, *H* aromático), 7,48 - 7,40 (m, 1H, *H* aromático), 7,32 (ddd, *J* = 7,8, 1,9, 1,0 Hz, 1H, *H* aromático), 7,29 - 7,27 (m, 1H, *H* aromático), 7,24 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H, *H* aromático), 7,01 (ddd, *J* = 8,0, 2,4, 1,0 Hz, 1H, *H* aromático), 6,92 (dd, *J* = 8,6, 0,7 Hz, 1H, *H* aromático), 3,40 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 1,48 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,81, 155,65, 153,31, 138,69, 134,40, 129,10, 126,99, 120,85, 117,23, 116,69, 112,54, 34,89, 31,41.

10

15

4-(4-(terc-Butil)fenoxi)-3-fluoroanilina, I3-I

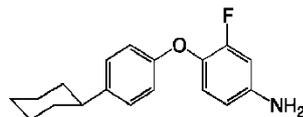


Seguendo el procedimiento B, I3-nI (501 mg, 1,73 mmol, 1,00 eq) se disolvió en MeOH (13 ml) y se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (56 mg, 0,05 mmol de Pd, 0,03 eq) en MeOH (2 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (5×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (455 mg, 1,75 mmol, rendimiento cuant.). *R<sub>f</sub>* = 0,76 (DCM/MeOH 1%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>FNO<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 260,1445, encontrado: 260,1442. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,37 - 7,29 (m, 2H, *H* aromático), 6,94 (t, *J* = 8,8 Hz, 1H, *H* aromático), 6,91 - 6,85 (m, 2H, *H* aromático), 6,52 (dd, *J* = 12,0, 2,7 Hz, 1H, *H* aromático), 6,42 (ddd, *J* = 8,6, 2,7, 1,3 Hz, 1H, *H* aromático), 3,61 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 1,33 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,58, 156,44, 154,12, 145,02, 144,42, 144,33, 134,83, 134,71, 126,41, 123,92, 123,90, 115,43, 110,97, 110,93, 103,93, 103,72, 34,25, 31,59.

20

25

4-(4-Ciclohexilfenoxi)-3-fluoroanilina, I3-J



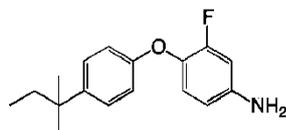
Seguendo el procedimiento B, I3-nJ (550 mg, 1,74 mmol, 1,00 eq) se disolvió en MeOH (12 ml) y se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (46 mg, 0,04 mmol de Pd, 0,03 eq) en MeOH (3 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (6×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM/éter de petróleo de 1:1 a 2:1) para dar el compuesto del título como un sólido rosa pálido (489 mg, 1,71 mmol, rendimiento del 98%). *R<sub>f</sub>* = 0,81 (DCM/MeOH 4%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>FNO<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 286,1602, encontrado: 286,1613. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,19 - 7,10 (m, 2H, *H* aromático), 6,93 (t, *J* = 8,8 Hz, 1H, *H* aromático), 6,90 - 6,83 (m, 2H, *H* aromático), 6,51 (dd, *J* = 12,1, 2,7 Hz, 1H, *H* aromático), 6,41 (ddd, *J* = 8,6, 2,7, 1,2 Hz, 1H, *H* aromático), 3,66 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,52 - 2,45 (m, 1H, *H* ciclohexilo), 1,96 - 1,72 (m, 5H, *H* ciclohexilo), 1,53 - 1,18 (m, 5H, *H* ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,74, 156,55, 154,09, 144,39, 144,30, 142,04, 134,86, 134,74, 127,79, 123,89, 115,76, 110,93, 110,90, 103,90, 103,69, 43,80, 34,72, 26,99, 26,22.

30

35

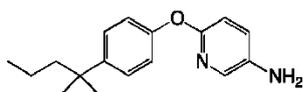
40

3-Fluoro-4-(4-terc-pentil)fenoxi)anilina, I3-K



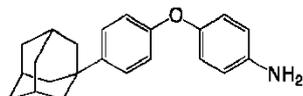
5 Siguiendo el procedimiento B, I3-nK (497 mg, 1,64 mmol, 1,00 eq) se disolvió en MeOH (13 ml) y se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (28 mg, 0,03 mmol de Pd, 0,02 eq) en MeOH (2 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (6×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; acetato de etilo/éter de petróleo de 1:10 a 1:7,5) para dar el compuesto del título como un aceite anaranjado (463 mg, 1,69 mmol, rendimiento cuant.). R<sub>f</sub> = 0,28 (EtOAc/éter de petróleo 1:5). HRMS (ESI) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>FNO<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 274,1602, encontrado: 274,1599. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,26 - 7,17 (m, 2H, *H* aromático), 6,92 (t, *J* = 8,8 Hz, 1H, *H* aromático), 6,89 - 6,80 (m, 2H, *H* aromático), 6,51 (dd, *J* = 12,0, 2,7 Hz, 1H, *H* aromático), 6,42 (ddd, *J* = 8,7, 2,7, 1,2 Hz, 1H, *H* aromático), 3,65 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 1,61 (q, *J* = 7,4 Hz, 2H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,26 (s, 6H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,69 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,61, 156,37, 154,15, 144,34, 144,25, 143,34, 134,98, 134,86, 123,95, 123,92, 115,41, 110,98, 110,95, 104,00, 103,78, 37,07, 28,68, 9,26.

6-(4-(2-Metilpentan-2-il)fenoxi)piridin-3-amina, I3-L



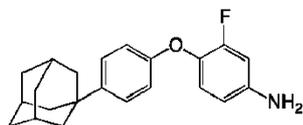
15 Siguiendo el procedimiento B, I3-nL (50 mg, 0,17 mmol, 1,00 eq) se disolvió en MeOH (12 ml) y se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (31 mg, 0,03 mmol de Pd, 0,17 eq) en MeOH (3 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (6×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM/MeOH 1%) para dar el compuesto del título como un aceite anaranjado pálido (39 mg, 0,14 mmol, rendimiento del 87%). R<sub>f</sub> = 0,41 (DCM/MeOH 4%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 271,1805, encontrado: 271,1796. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,73 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H, *H* aromático), 7,32 - 7,26 (m, 2H, *H* aromático), 7,07 (dd, *J* = 8,6, 3,0 Hz, 1H, *H* aromático), 7,01 - 6,94 (m, 2H, *H* aromático), 6,74 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, *H* aromático), 3,35 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 1,61 - 1,51 (m, 2H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,27 (s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,16 - 1,01 (m, 2H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,82 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,82, 153,32, 145,10, 138,67, 134,32, 128,12, 127,09, 126,99, 119,62, 119,13, 112,53, 47,31, 37,49, 29,17, 18,08, 14,90.

25 4-(4-((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1-il)fenoxi)anilina, I3-M



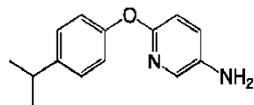
30 Siguiendo el procedimiento B, I3-nM (615 mg, 1,76 mmol, 1,00 eq) se disolvió en tolueno (15 ml) y se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (126 mg, 0,12 mmol de Pd, 0,07 eq) en MeOH (10 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (6×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 19 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM) para dar el compuesto del título como un sólido beis (538 mg, 1,68, rendimiento del 96%). R<sub>f</sub> = 0,39 (DCM/MeOH 1%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>NO<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 320,2009, encontrado: 320,2006. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,32 - 7,25 (m, 2H, *H* aromático), 6,93 - 6,86 (m, 4H, *H* aromático), 6,72 - 6,65 (m, 2H, *H* aromático), 3,56 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,14 - 2,06 (m, 3H, *H* adamantilo), 1,90 (d, *J* = 2,9 Hz, 5H, *H* adamantilo), 1,84 - 1,71 (m, 5H, *H* adamantilo). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,59, 149,02, 145,32, 142,51, 125,98, 121,10, 116,84, 116,34, 43,45, 36,88, 35,78, 29,07.

35 4-(4-((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1-il)fenoxi)-3-fluoroanilina, I3-N



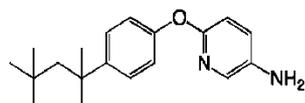
40 Siguiendo el procedimiento B, I3-nN (570 mg, 1,55 mmol, 1,00 eq) se disolvió en tolueno (10 ml) y se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (143 mg, 0,13 mmol de Pd, 0,09 eq) en MeOH (10 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (6×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (510 mg, 1,51, rendimiento del 97%). R<sub>f</sub> = 0,67 (DCM/MeOH 1%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>FNO<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 338,1915, encontrado: 338,1916. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,32 - 7,23 (m, 2H, *H* aromático), 6,92 (t, *J* = 8,8 Hz, 1H, *H* aromático), 6,89 - 6,81 (m, 2H, *H* aromático), 6,51 (dd, *J* = 12,0, 2,7 Hz, 1H, *H* aromático), 6,41 (ddd, *J* = 8,7, 2,7, 1,2 Hz, 1H, *H* aromático), 3,64 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,11 - 2,07 (m, 3H, *H* adamantilo), 1,89 (d, *J* = 2,9 Hz, 5H, *H* adamantilo), 1,83 - 1,70 (m, 5H, *H* adamantilo). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,60, 156,47, 154,15, 145,37, 144,33, 144,24, 134,91, 134,79, 125,98, 123,97, 123,95, 115,47, 110,98, 110,95, 103,98, 103,76, 43,43, 36,86, 35,76, 29,06.

## 6-(4-(Isopropilfenoxi)piridin-3-amina, I3-O



5 Siguiendo el procedimiento B, I3-O (202 mg, 0,78 mmol, 1,00 eq) se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (76 mg, 0,07 mmol de Pd, 0,09 eq) en MeOH (15 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (6×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM/MeOH 1%) para dar el compuesto del título como un sólido beis (150 mg, 0,66 mmol, rendimiento del 84%). R<sub>f</sub> = 0,42 (DCM/MeOH 4%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 229,1335, encontrado: 229,1326. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,70 (d, J = 2,9 Hz, 1H, H aromático), 7,24 - 7,14 (m, 2H, H aromático), 7,05 (dd, J = 8,6, 3,0 Hz, 1H, H aromático), 7,01 - 6,93 (m, 2H, H aromático), 6,73 (d, J = 8,6 Hz, 1H, H aromático), 3,33 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,89 (hept, J = 6,9 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,24 (d, J = 7,0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,88, 153,59, 144,19, 138,68, 134,19, 127,55, 126,97, 119,76, 112,35, 77,48, 77,16, 76,84, 33,57, 24,20.

## 6-(4-(2,4,4-Trimetilpentan-2-il)fenoxi)piridin-3-amina, I3-P



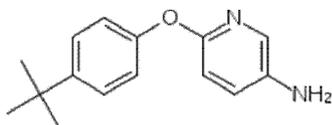
15 Siguiendo el procedimiento B, I3-nP (283 mg, 0,86 mmol, 1,00 eq) se disolvió en tolueno (4 ml) y se añadió a una suspensión de Pd (10%) sobre polvo de carbón activado (78 mg, 0,07 mmol de Pd, 0,09 eq) en MeOH (15 ml). El matraz se purgó con H<sub>2</sub> (5×) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>; DCM/MeOH 2%) para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (235 mg, 0,79 mmol, rendimiento del 91%). R<sub>f</sub> = 0,49 (DCM/MeOH 4%). HRMS (ESI) calculado para C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 299,2118, encontrado: 299,2112. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,73 (dd, J = 3,0, 0,7 Hz, 1H, H aromático), 7,37 - 7,29 (m, 2H, H aromático), 7,06 (dd, J = 8,6, 3,0 Hz, 1H, H aromático), 6,99 - 6,93 (m, 2H, H aromático), 6,71 (dd, J = 8,6, 0,7 Hz, 1H, H aromático), 3,10 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 1,72 (s, 2H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,36 (s, 6H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,73 (s, 9H, Ar-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156,87, 153,39, 145,48, 138,70, 134,39, 127,37, 126,94, 118,96, 112,41, 57,20, 38,36, 32,50, 31,93, 31,68.

25

REIVINDICACIONES

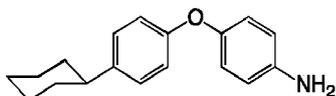
1. Un compuesto para uso en el tratamiento y/o la prevención de un cáncer dependiente de Notch, en donde dicho compuesto que tiene propiedades de inhibición de la vía de señalización de Notch se selecciona del grupo que consiste en:

5 6-(4-(*terc*-butilfenoxi)piridin-3-amina (I3) de fórmula I



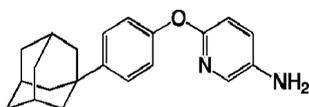
Fórmula I

4-(4-ciclohexilfenoxi)anilina de fórmula III a



Fórmula III a

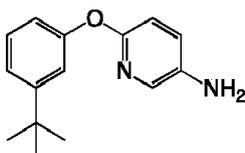
6-(4-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-il)fenoxi)piridin-3-amina de fórmula IVa



10

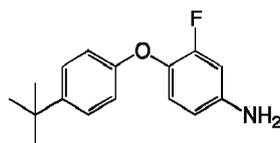
Fórmula IV a

6-(3-(*terc*-butil)fenoxi)piridin-3-amina de fórmula IIe



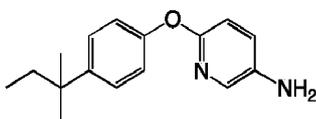
Fórmula II e

4-(4-(*terc*-butil)fenoxi)-3-fluoroanilina de fórmula II f



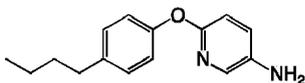
Fórmula II f

15 6-(4-(*terc*-pentil)fenoxi)piridin-3-amina de fórmula IIg



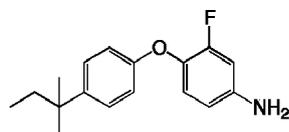
Fórmula II g

6-(4-butilfenoxi)piridin-3-amina de fórmula IIh



Fórmula II h

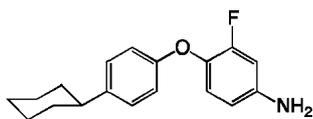
3-Fluoro-4-(4-(*terc*-pentil)fenoxi)anilina de fórmula II i



20

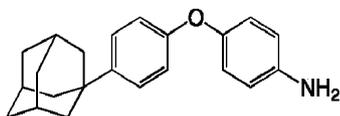
Fórmula II i

4-(4-Ciclohexilfenoxi)-3-fluoroanilina de fórmula III b



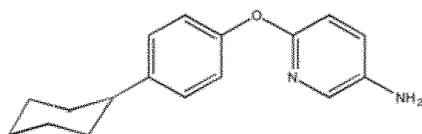
Fórmula III b

4-(4-((3r,5r,7r)-adamantan-1-il)fenoxi)-3-fluoroanilina de fórmula IVb



Fórmula IV b

6-(4-ciclohexilfenoxi)piridin-3-amina de fórmula IIIc



Fórmula III c

5

o una de sus sales, solvatos, tautómeros o estereoisómeros de los mismos.

2. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer dependiente de Notch se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (LLA-T), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma de células de Mantle (LCM), cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, melanoma, tumores de cerebro, angiogénesis tumoral y cáncer colorrectal.

10

3. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el cáncer dependiente de Notch es resistente al tratamiento con inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa.

4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o sales, solvatos, tautómeros, estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. Un kit que comprende una o varias dosis de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento y/o la prevención de un cáncer dependiente de Notch, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso.

15

6. El kit de acuerdo con la reivindicación 5, que además comprende una o varias dosis de un agente quimioterápico.

7. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la inhibición *in vitro* de la vía de señalización de Notch en las células.

20

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde las células son células cancerosas.

9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento y/o la prevención de un cáncer dependiente de Notch, en donde las propiedades de inhibición de la vía de señalización de Notch en las células cancerosas se determina mediante un ensayo de la actividad del complejo de la  $\gamma$ -secretasa *in vitro*.

10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento y/o la prevención de un cáncer dependiente de Notch, en donde dicho tratamiento y/o prevención de un cáncer dependiente de Notch comprende además al menos un tratamiento convencional contra el cáncer.

25

11. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde se administra el tratamiento convencional contra el cáncer antes, simultáneamente o después de la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4.

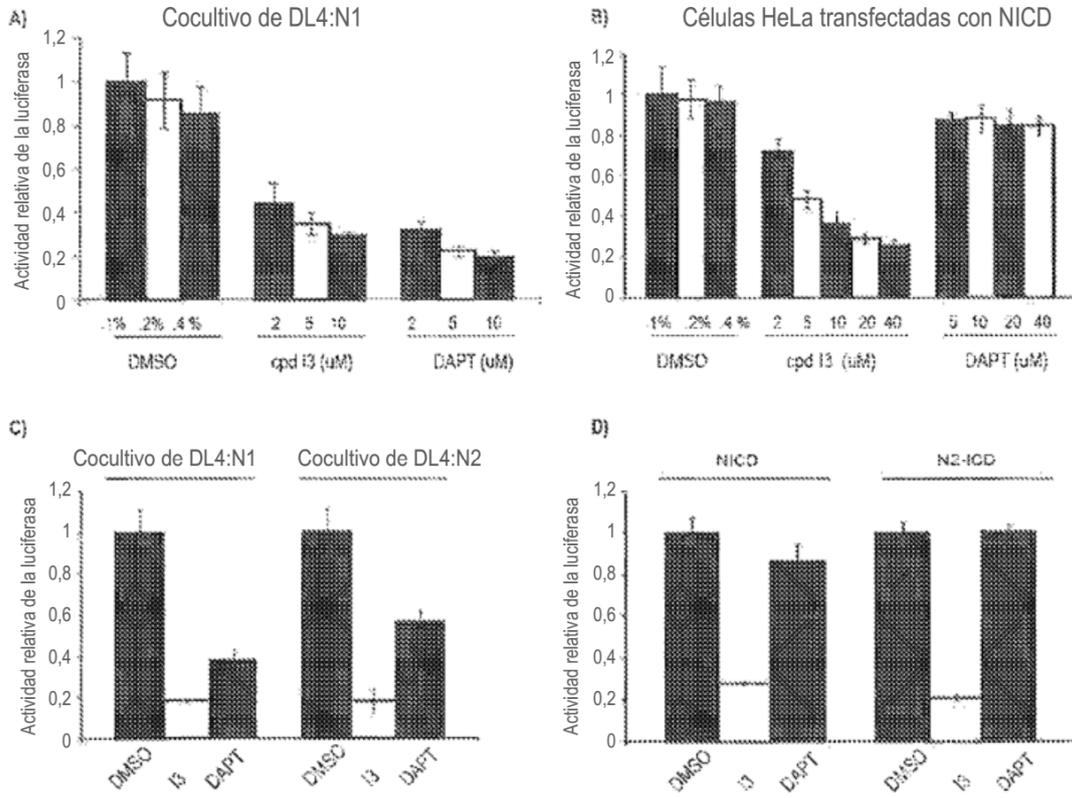
30

12. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde el tratamiento convencional contra el cáncer consiste en radioterapia y/o quimioterapia.

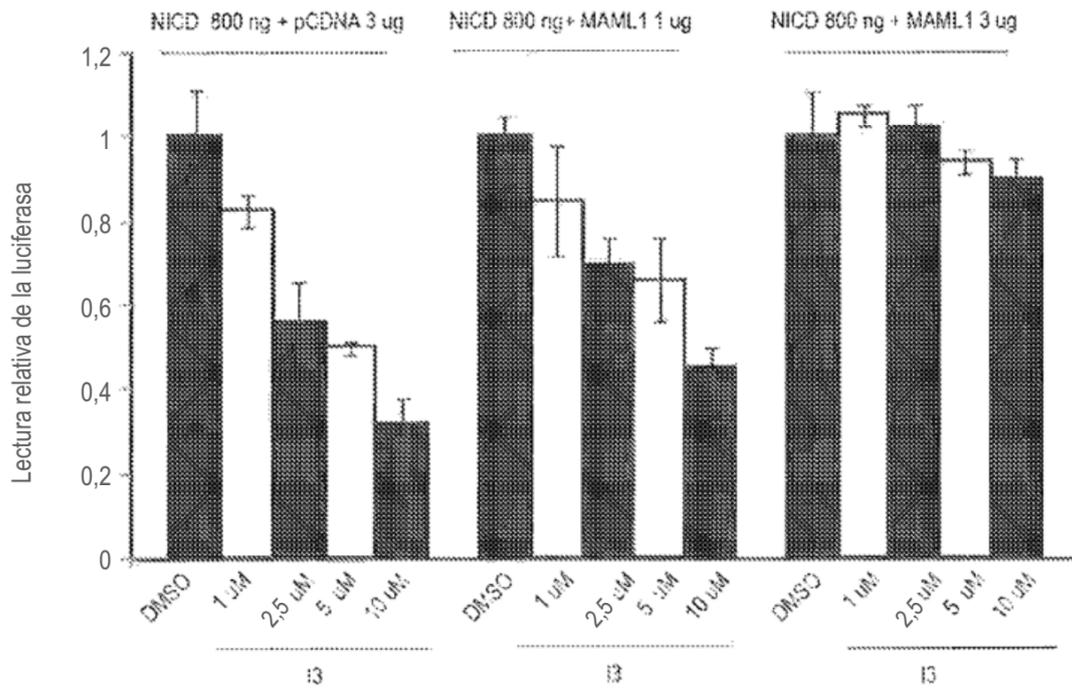
13. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento y/o la prevención de un cáncer dependiente de Notch, en donde dicho cáncer dependiente de Notch está asociado a un aumento de la actividad de la vía de señalización de Notch.

35

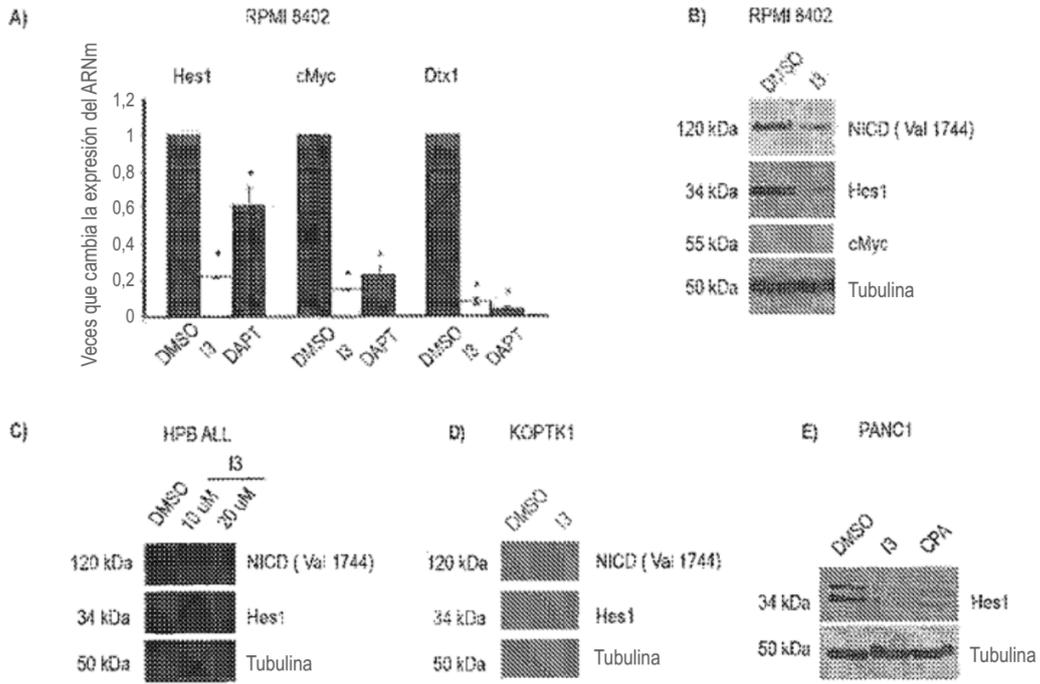
**Figura 1**



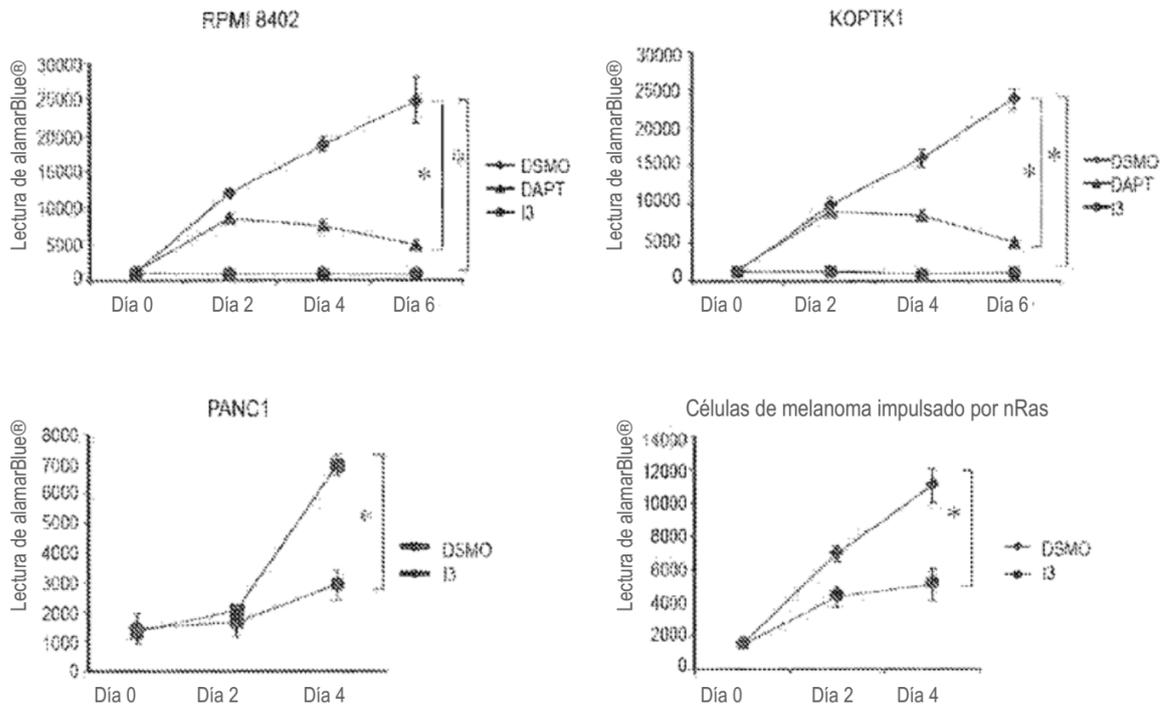
**Figura 2**



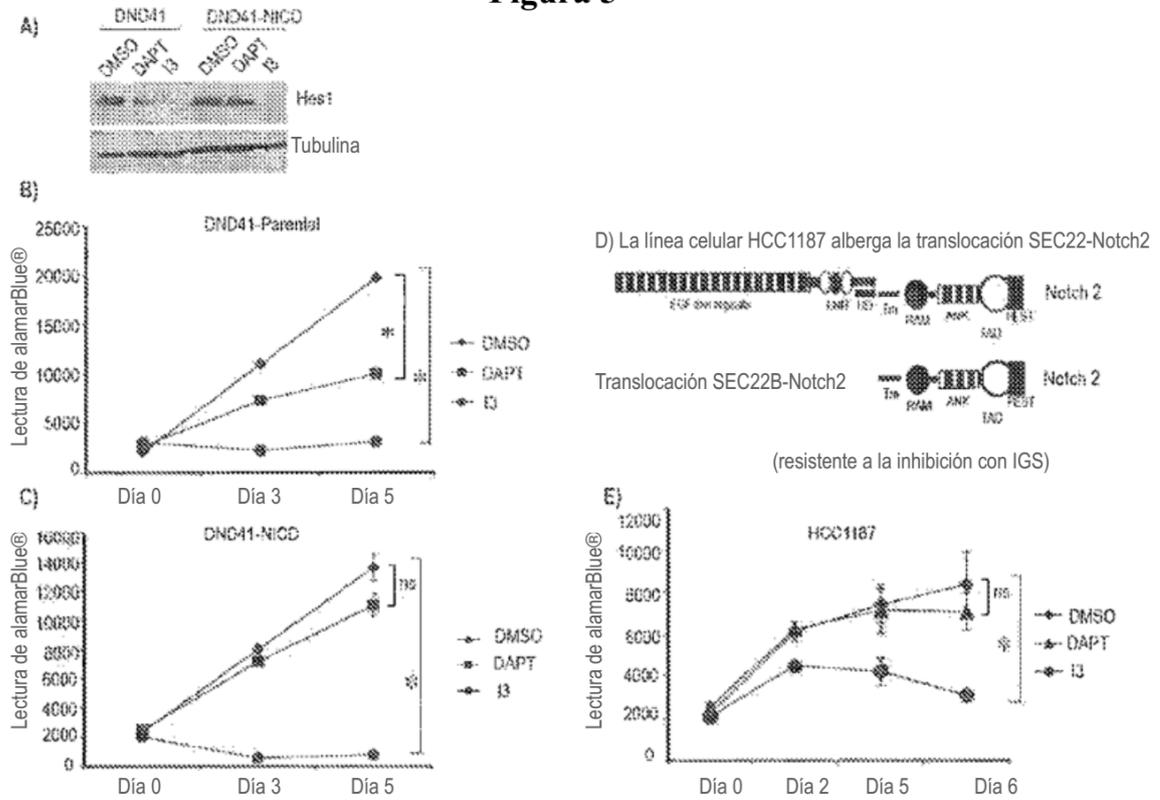
**Figura 3**



**Figura 4**

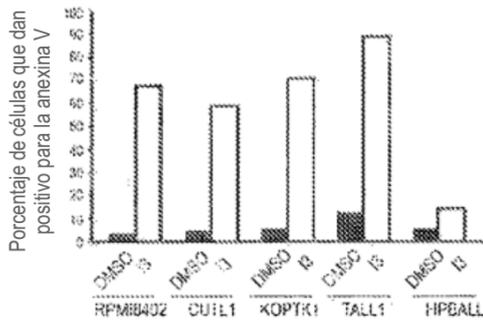


**Figura 5**



**Figura 6**

A) I3 induce la apoptosis en las líneas celulares de leucemia de humano

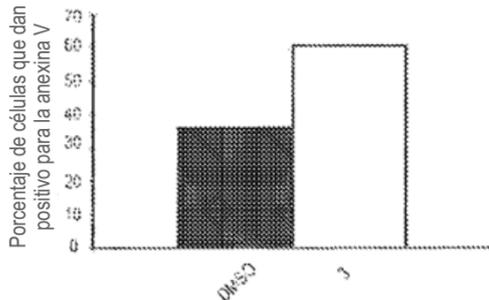


B) El tratamiento con I3 provoca la parada del ciclo celular en G0/G1 en las líneas celulares de leucemia de humano

Proporción de células en la fase G0/G1 del ciclo celular

	RPMB402	KOPTK1	TALL1
DMSO	54 %	58 %	62 %
I3	74 %	80 %	90 %

C) El tratamiento con I3 induce la apoptosis en la línea celular HCC1187

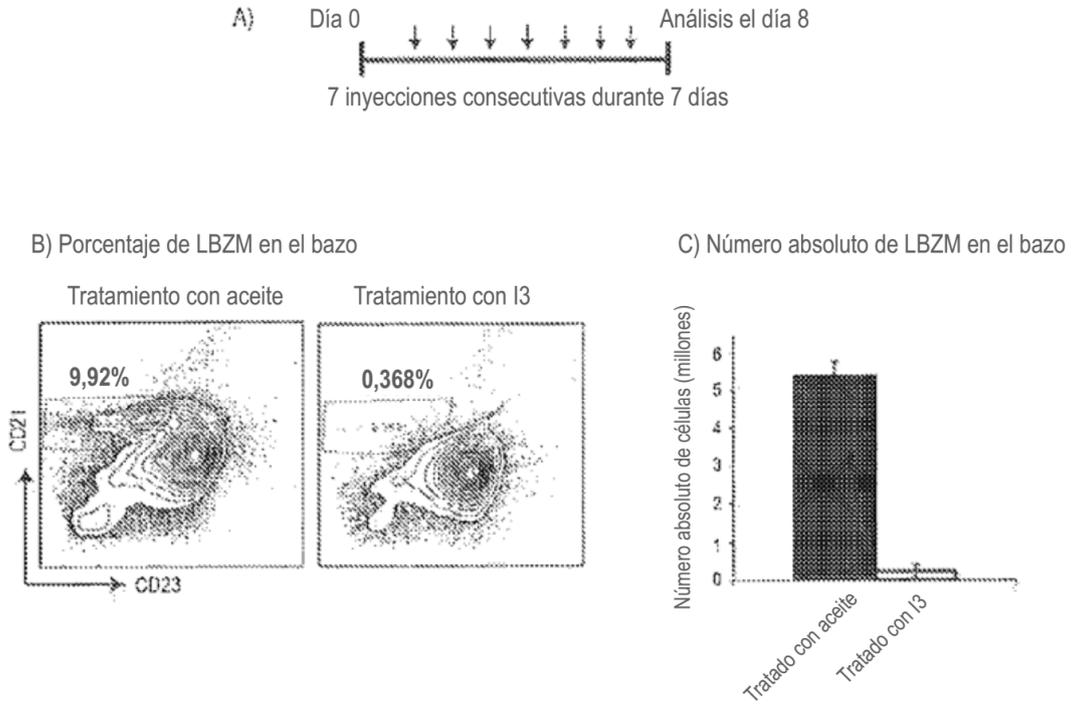


D) El tratamiento con I3 induce la parada del ciclo celular en G0/G1 en las células HCCC1187

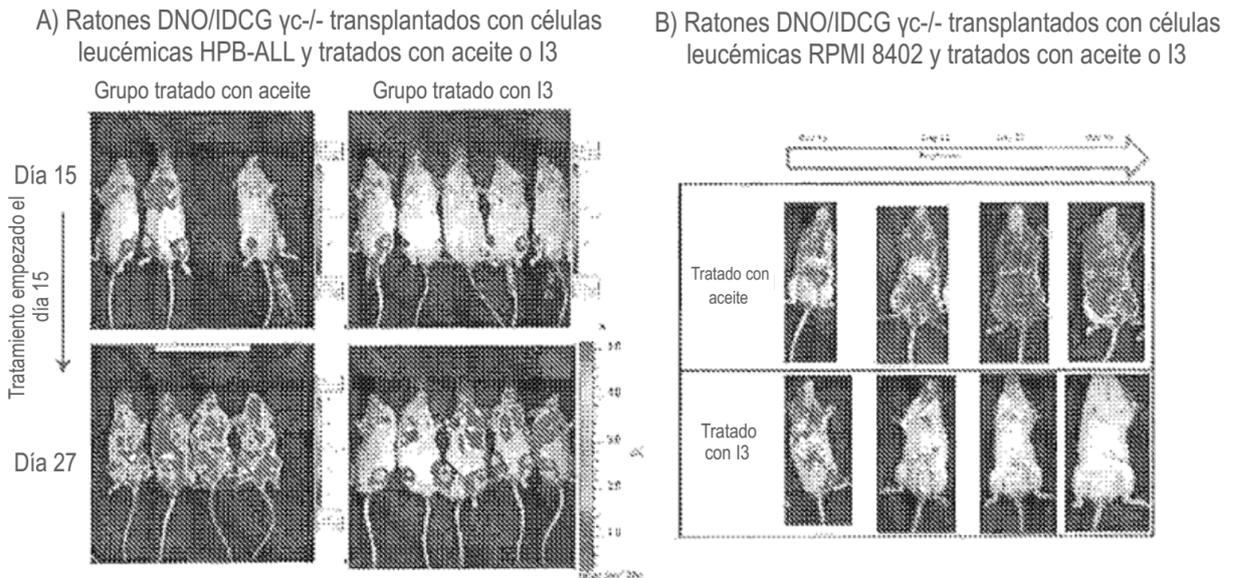
Proporción de células en la fase G0/G1 del ciclo celular

	HCC1187
DMSO	54 %
I3	74 %

**Figura 7**

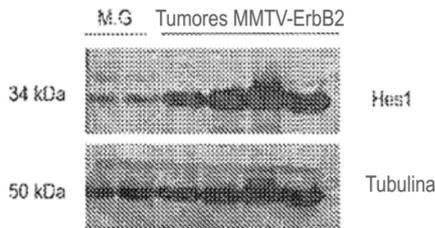


**Figura 8**

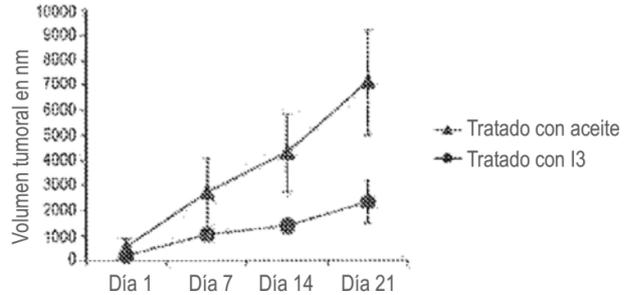


**Figura 9**

A) Activación de la señalización de Notch en tumores de mama de ratonas MMTV-ErbB2



B) El tratamiento con I3 de tumores de mama impulsados por MMTV-ErbB2 bloquea la progresión tumoral



**Figura 10**

